

Archives of Oral Biology

Volume 4 1961

Proceedings of the 7th Congress of the
European Organization for Research
on Fluorine and Dental Caries Prevention

Hamburg 2-4 June 1960

Edited for ORCA by
G. GUSTAFSON



PERGAMON PRESS LTD.

Oxford

London

New York

Paris

REGIONAL EDITORS

- Prof. Dr. med. H. D. CREMER, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus Liebig-Universität Giessen, Wilhelmstrasse 20, Giessen, Germany.
- Dr. R. M. FRANK, Institut Dentaire, Faculté de Médecine, Strasbourg, France.
- Dr. R. C. GREULICH, Department of Anatomy, University of California Medical Center, Los Angeles 24, California.
- Mr. IVOR R. H. KRAMER, Institute of Dental Surgery, Eastman Dental Hospital, Gray's Inn Road, London W.C.1.
- Dr. J. B. MACDONALD, The Forsyth Dental Infirmary, 140 The Fenway, Boston 15, Mass., U.S.A.
- Professor A. E. W. MILES, Department of Dental Histology and Pathology, London Hospital Medical College, Turner Street, London E.1.

HONORARY EDITORIAL ADVISORY BOARD

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| P. ADLER (Debrecen, Hungary) | M. L. MOSS (New York) |
| A. B. P. AMES (Melbourne) | H. R. MÜHLEMANN (Zurich) |
| F. A. ARNOLD, Jr.* (Bethesda, Md.) | G. NIKIFORUK (Toronto) |
| O. BACKER-DIRKS (Utrecht) | P. O. PEDERSEN (Copenhagen) |
| K. A. BISSET (Birmingham, England) | R. W. PHILLIPS (Indianapolis) |
| F. BRAMSTEDT (Hamburg) | W. PIGMAN (New York) |
| F. A. CARRANZA, Jr. (Buenos Aires) | H. B. G. ROBINSON (Kansas City) |
| D. H. COPP (Vancouver) | T. ROSEBURY (St. Louis) |
| H. DALLEMAGNE (Liège) | M. A. RUSHTON* (London) |
| G. N. DAVIES (Dunedin, New Zealand) | A. L. RUSSEL (Bethesda, Md.) |
| D. DZIEWIATKOWSKI (New York) | I. SCHOUR (Chicago) |
| Y. ERICSSON (Stockholm) | D. B. SCOTT (Bethesda, Md.) |
| R. O. GREEP (Boston) | F. R. SHROFF (Dunedin, New Zealand) |
| R. L. HARTLES (Liverpool) | R. F. SOGNAES (Boston) |
| D. HATTYASY (Szeged, Hungary) | M. V. STACK (Bristol) |
| J. W. HEIN (New Brunswick) | J. STAZ (Johannesburg) |
| A. J. HELD (Geneva) | A. SYRRIST (Malmö) |
| E. E. HUNT (Boston) | R. J. S. TICKLE (Singapore) |
| J. T. IRVING (Boston) | J. F. VOLKER (Birmingham, Alabama) |
| G. N. JENKINS (Newcastle upon Tyne) | J. WAERHAUG (Oslo) |
| B. S. KRAUS (Seattle) | J. P. WALSH (Dunedin, New Zealand) |
| C. P. LEBLOND (Montreal) | Y. WATANABE (Okayama) |
| B. LILIENTHAL (Melbourne) | N. B. WILLIAMS (Philadelphia) |
| S. MATSUMIYA (Tokyo) | |

*Joint Chairmen of the Board

Publishing Offices: Headington Hill Hall, Oxford (Oxford 64881)

Annual subscription (including postage):

- (A) For libraries, government establishments and research institutions £14 (\$40.00)
- (B) For individuals who write directly to the publisher and certify that the journal is for their personal use £5 5s. (\$15.00)

Copyright © 1961

Pergamon Press Ltd.

PERGAMON PRESS LTD.

Headington Hill Hall,
Oxford122 East 55th Street,
New York 22, N.Y.Vol.
4
1961

EDITORIAL NOTE

The papers in this volume were presented at the ORCA Meeting held in Hamburg during June 1960. They have not been submitted to the usual refereeing and no editorial amendments have been made by the Editors of *Archives of Oral Biology*.

CONTENTS OF VOLUME 4

Proceedings of the 7th Congress of the European Organization for Research on Fluorine and Dental Caries Prevention

	page
A. J. HELD, C. A. BAUD et G. FIORE: Étude microradiographique de dents humaines fossiles .	1
G. BERGMAN, GERTRUD GÖTHE and E. WELANDER: Studies on mineralized dental tissues—XV. Mineral pattern of dentine	6
R. W. FEARNEHEAD: Electron microscopy of forming enamel	24
R. M. FRANK: Conceptions nouvelles concernant l'émail et sa genèse	29
H. LENZ: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Mineralisation des Zahnschmelzes und der beginnenden Schmelzkaries	34
H. SCHÜLE: Chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften des Schmelzober- häutchens	40
H. HEUSER: Die Struktur des menschlichen Zahnschmelzes im oberflächenhistologischen Bild (Replica-Technik)	50
F. MANNERBERG: Changes in the enamel surface in cases of erosion. A replica study	59
H. SCHMIDT: Ein Beitrag zur Morphologie der Interglobularräume im verkalkten Dentin und ihr Nachweis nach der Entkalkung	63
ANNA-GRETA GUSTAFSON: The histology of fluorosed teeth	67
W. G. PERDOK and G. GUSTAFSON: X-ray diffraction studies of the insoluble protein in mature human enamel	70
M. HERRMANN: Härtemessungen am normalen und erkrankten Zahnhartgewebe	76
A. I. DARLING: The structure of the enamel revealed in dental disease	80
A. B. MACGREGOR: The position and extent of acid in the carious process	86
J. H. FREMLIN and J. MATHIESON: A microchromatographic study of the penetration of enamel by C ¹⁴ -labelled glucose	92
J. L. HARDWICK: Isotope studies on the penetration of glucose into normal and carious enamel and dentine	97
R. WEILL: Détection et localisation des protides sulfhydrilés au cours de l'odontogénèse chez le rat blanc	101
B. KEREBEL: Les structures organiques de l'émail et les théories protéolytiques des caries	107
F. VON BARTHELD: Membrane phenomena in carious dissolution of the teeth	120
O. R. TRAUTZ and R. R. ZAPANTA: Experiments with calcium carbonate phosphates and the effect of topical application of sodium fluoride	122
A. BREUSTEDT: Kritische Betrachtungen zur Chelationswirkung von Aminosäuren auf den Zahnschmelz	134
H. EGGERS LURA: An investigation into the relation between the sialic acid of saliva and dental caries	141

G. BERGMAN, M. BRÄNNSTRÖM und P. O. LIND: Schmelzkaries. Eine kombinierte lichtmikroskopische, mikroradiographische und histochemische Untersuchung. Vorläufige Mitteilung	147
A. G. E. SCHMIDT: Elektronenmikroskopische Untersuchungen mechanischer und chemischer Verletzungen des Schmelzes	151
W. D. ARMSTRONG: Mechanisms of fluoride homeostasis	156
Y. ERICSSON, G. SANTESSON and S. ULLBERG: Absorption and metabolism of the PO_4F ion in the animal body	160
G. AHRENS und B. RANKE: Organische Phosphate im menschlichen Speichel	175
R. NAUJOKS, F. BRAMSTEDT, E. RANKE und A. KRÖNCKE: Beziehungen zwischen der Aldolaseaktivität des Speichels und der Karies	179
O. BACKER DIRKS, B. HOUWINK and G. W. KWANT: Some special features of the caries preventive effect of water-fluoridation	187
P. ADLER und I. PORCSALMY: Neuere Versuche über den karies-protektiven Effekt des im Trinkwasser enthaltenen Molybdäns	193
H. LINGELBACH: Organisierung, Durchführung und Erfahrungen der Trinkwasserfluoridierung in Karl-Marx-Stadt—I. Bericht	199
G. HENKEL: Trinkwasseranalysen und Karies im Kalibergbaugebiet Westthüringens	204
F. SINGER: Die Bedeutung des klimatischen Faktors in der Kariesätiologie	212
J. H. FREMLIN and J. MATHIESON: A new technique for grinding thin sections of dental enamel	216
L. J. BAUME: ORCA Team I on caries statistics. Directives for collecting and recording data on dental caries increments by means of serial examinations	217
K.-E. QUENTIN: Arbeitsbericht ORCA-Team III	224

AUTHOR INDEX

Volume 4 1961

Adler, P. p. 193	Fremlin, J. H. pp. 92, 216	Mathieson, J. pp. 92, 216
Ahrens, G. p. 175	Göthe, G. p. 6	Naujoks, R. p. 179
Armstrong, W. D. p. 156	Gustafson, A.-G. p. 67	Perdok, W. G. p. 70
Backer Dirks, O. p. 187	Gustafson, G. p. 70	Porcsalmy, I. p. 193
Bartheld, F. von p. 120	Hardwick, J. L. p. 97	Quentin, K.-E. p. 224
Baud, C. A. p. 1	Held, A. J. p. 1	Ranke, B. p. 175
Baume, L. J. p. 217	Henkel, G. p. 204	Ranke, E. p. 179
Bergman, G. pp. 6, 147	Herrmann, M. p. 76	Santesson, G. p. 160
Bramstedt, F. p. 179	Heuser, H. p. 50	Schmidt, A. G. E. p. 151
Brännström, M. p. 147	Houwink, B. p. 187	Schmidt, H. p. 63
Breustedt, A. p. 134	Kerebel, B. p. 107	Schüle, H. p. 40
Darling, A. I. p. 80	Kröncke, A. p. 179	Singer, F. p. 212
Eggers Lura, H. p. 141	Kwant, G. W. p. 187	Trautz, O. R. p. 122
Ericsson, Y. p. 160	Lenz, H. p. 34	Ullberg, S. p. 160
Fearnhead, R. W. p. 24	Lind, P. O. p. 147	Weill, R. p. 101
Fiore, G. p. 1	Lingelbach, H. p. 199	Welander, E. p. 6
Frank, R. M. p. 29	MacGregor, A. B. p. 86	Zapanta, R. R. p. 122
	Mannerberg, F. p. 59	

ÉTUDE MICRORADIOGRAPHIQUE DE DENTS HUMAINES FOSSILES

A. J. HELD, C. A. BAUD et G. FIORE

Institut de Médecine Dentaire et Institut de Morphologie,
Université de Genève, Genève, Suisse

Résumé—Les dents humaines de la période néolithique et de l'âge de bronze présentent des défauts de minéralisation dans la dentine (dentine interglobulaire, granuleuse ou aréolaire, lignes d'accroissement d'Owen) et dans l'émail (buissons, lamelles, lignes d'accroissement de Retzius) qui sont mises en évidence par la microradiographie des coupes. Ces microhypoplasies sont très semblables à celles que montrent les dents des hommes actuels.

Abstract—Human teeth from the neolithic and bronze ages were found to have defects in mineralization in the dentine (interglobular, granular or areolar dentine, and incremental lines of Owen) and in the enamel (tufts, lamellae and Retzius lines) revealed by microradiographs of ground sections. The areas of micro-hypoplasia were very similar to those shown by the teeth of modern man.

Zusammenfassung—Durch mikroradiographische Untersuchungen an Schliffen menschlicher Zähne aus der neolithischen Periode und aus der Bronzezeit konnten Mängel in der Mineralisation des Dentins (Interglobulardentin, körniges oder areoläres Dentin, Owen'sche Linien) und des Schmelzes (Büschel, Lamellen, Retzius-Streifen) gezeigt werden. Diese Mikrohypoplasien sind denen an den Zähnen des heutigen Menschen sehr ähnlich.

INTRODUCTION

DANS le développement des processus pathologiques, qu'ils soient de nature toxico-infectieuse, dégénérative ou autre, le problème de la structure et de la composition tissulaire joue un rôle important. Au niveau des tissus dentaires cet aspect de la question est reconnu depuis longtemps, cela d'autant plus que les parties minéralisées de la dent conservent une structure relativement stable à l'égard de l'influence des facteurs endogènes susceptibles de modifier l'image et la composition du tissu osseux. Par contre, ces mêmes parties dentaires sont très sensibles à l'action de facteurs externes divers qui sont en mesure d'en provoquer la destruction. Mais au cours de la période de développement, les tissus de la dent peuvent être influencés d'une manière appréciable par des variations ou des accidents métaboliques momentanés et très limités dans le temps, qu'il s'agisse de déséquilibres diététiques, de perturbations de l'équilibre hormonal, de maladies infectieuses ou de phénomènes tels que le trauma obstétrical agissant en tant que changement brusque de certaines conditions métaboliques. Dans le domaine expérimental MELLANBY (1929) a montré la possibilité d'influencer la calcification des tissus dentaires chez le chien en modifiant la composition de l'alimentation. Dans le même ordre de faits, les macro- et microhypoplasies des dents de sujets rachitiques sont bien connues.

Dans une étude précédente (HELD et BAUD, 1958), nous avons déjà insisté sur la distribution de ces microhypoplasies au sein des tissus dentaires, en particulier dans l'émail et la dentine, et montré, comme d'autres auteurs, que ces anomalies de structure jouent certainement un rôle favorisant, non pas tant la genèse de la carie dentaire, mais son développement et sa distribution une fois que le processus est amorcé.

En considérant l'irréversibilité de la structure dentaire d'une part, le fait que les anomalies structurales peuvent être expérimentalement provoquées par les diverses perturbations sus-mentionnées d'autre part, et enfin les corrélations pouvant exister entre ces anomalies et le développement de la carie dentaire, il peut être intéressant d'effectuer des recherches sur des dents appartenant à diverses périodes de l'histoire de l'humanité et provenant de régions variées du globe. A propos de ces documents, on peut être renseigné parallèlement au sujet de la structure et de la résistance à la carie dentaire, pour autant qu'on parvienne à éliminer les sources d'erreurs provenant d'influences modifiantes post-mortem. A titre comparatif, il est indiqué d'étudier chez des populations actuelles la structure des tissus provenant d'individus résistants à la carie, pour la mettre en parallèle avec celles de sujets particulièrement atteints par la carie, en tenant compte, bien entendu, à propos de ce type d'observation, de la chronologie du développement des tissus dentaires, c'est à dire en s'adressant à des dents se développant au même âge de l'individu.

L'étude de la structure des tissus dentaires des hommes préhistoriques a déjà fait l'objet d'un travail de SOGNAES (1956) qui est parvenu à la conclusion que dans les diverses dents qu'il a examinées et qui provenaient de sources très diverses (paléolithique palestinien correspondant à des sujets humains pouvant se situer entre l'homo sapiens pré-moustérien et l'homo neanderthalis, Egypte prédynastique, Grèce préhistorique, Moyen-âge norvégien, Indiens Pecos du Mexique central), les microhypoplasies sont déjà évidentes, et parfois nombreuses, alors qu'elles n'existent pas chez le singe rhésus. Par contre, on les observe, à un degré moins accentué que chez l'homme primitif ou actuel, chez les anthropoïdes supérieurs tels que chimpanzés, gorilles, orang-outans, etc. (SCHUMAN et SOGNAES, 1956).

Du point de vue structural, le problème peut être abordé par des voies différentes soit en recourant aux examens histologiques comme l'ont fait divers auteurs, ce qui donne des indications au sujet de la répartition et de la texture des composants morphologiques, soit en utilisant la microradiographie de coupes minces, ce qui fournit des informations à propos du degré de minéralisation, soit encore en appliquant des techniques histochimiques et minéralogiques.

Nous nous sommes proposés de recourir à la seconde de ces techniques, en soumettant à des examens microradiographiques des coupes minces de dents provenant de sujets humains recueillis sur territoire suisse et correspondant à deux périodes de civilisation bien déterminées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les dents utilisées pour ces recherches appartenaient à des dentures qui ne présentaient pas de caries. Elles se répartissent de la manière suivante:

Néolithique (Chamblandes, Vaud, Suisse: env. 5000 ans) 8 dents;

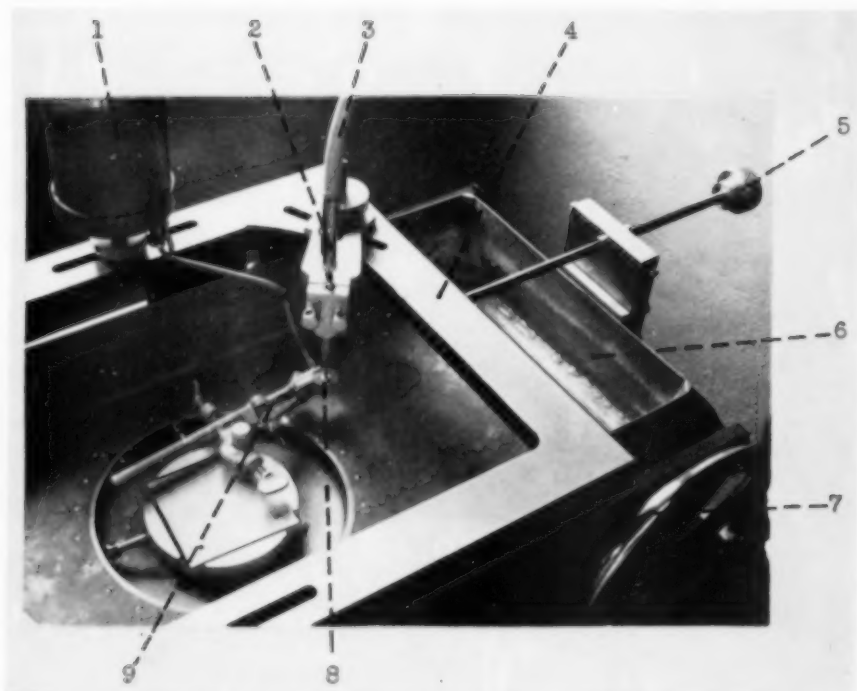


FIG. 1. Microtome selon BAUD et MORGENTHALER. 1. Réservoir d'eau pour le refroidissement; 2. Pièce à main de dentiste; 3. Câble flexible reliant la pièce à main au moteur; 4. Chariot porte-scie du microtome; 5. Avance micrométrique du chariot porte-scie; 6. Bac à immersion; 7. Avance rapide du chariot porte-scie; 8. Lame de scie circulaire (disque de carborundum ou disque diamanté); 9. Porte-objet (pince de Bunsen).

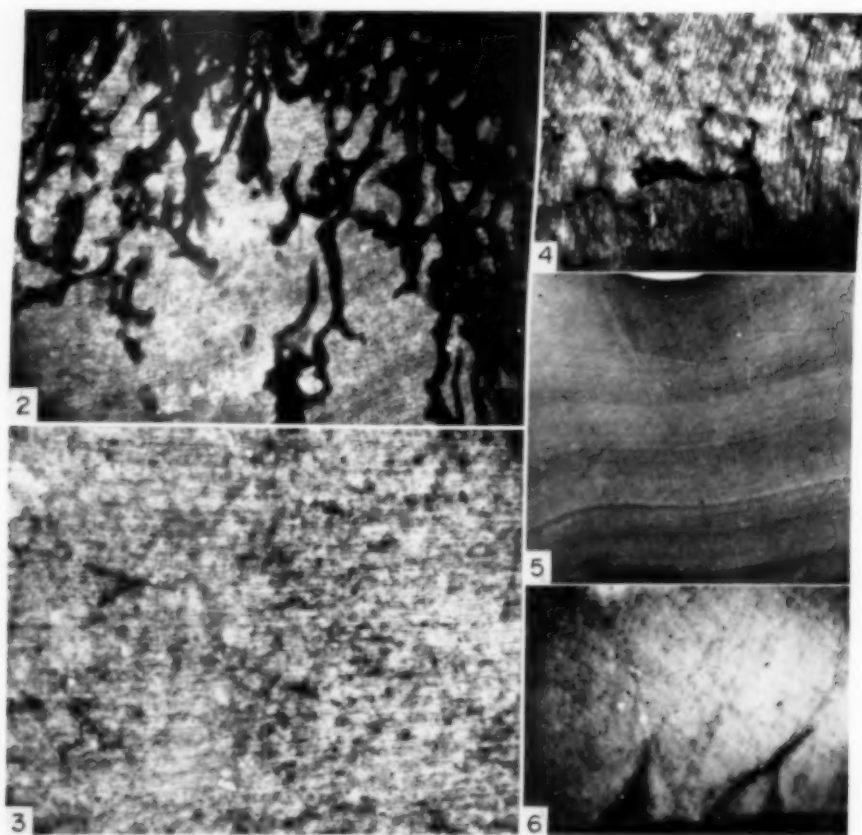


FIG. 2. Canaux de forage dans la dentine. Néolithique de Chamblandes. $\times 64$.

FIG. 3. Dentine aréolaire. Néolithique de Chamblandes. $\times 64$.

FIG. 4. Dentine interglobulaire. Néolithique de Chamblandes. $\times 64$.

FIG. 5. Lignes d'accroissement d'Owen dans la dentine. Néolithique de Collombey-Barmaz. $\times 10$.

FIG. 6. Buissons de l'émail et lignes d'accroissement de Retzius. Néolithique de Chamblandes. $\times 40$.

Néolithique (Collombey-Barmaz, Valais, Suisse: env. 5000 ans) 6 dents;

Bronze ancien (Champlan-Grimisuat, Valais, Suisse: env. 2600 ans) 3 dents.

Elles ont été incluses dans le méthacrylate de méthyle selon la méthode de BAUD et MORGENTHALER (1952). La plupart des coupes ont été effectuées par usure et polissage, à la main, de tranches débitées à la scie. Mais il s'est révélé avantageux d'utiliser, dès qu'il a été mis au point, le microtome de BAUD et MORGENTHALER (1959). Cet instrument (Fig. 1) qui est un microtome à immersion dont le couteau est remplacé par un disque diamanté animé d'un mouvement de rotation rapide, permet d'effectuer une quinzaine de coupes sériées par centimètre, suffisamment minces pour la micro-radiographie.

La technique microradiographique est celle de BAUD et MORGENTHALER (1956); elle utilise le rayonnement fourni par un tube Machlett A 2 pour diffraction, à anticathode de cuivre et fenêtre de beryllium de 0,5 mm d'épaisseur, alimenté sous 30 kV et 16 mA. Comme surfaces sensibles, le film Lippmann Gevaert et les plaques spectroscopiques 649-0 de Kodak ont été employés.

RÉSULTATS

Dentine

Il y a sur de nombreuses microradiographies des images de canaux de forage (Fig. 2) larges et de calibre irrégulier, creusés en tous sens à travers la dentine, sans orientation préférentielle par rapport à la direction des canalicules ou à la texture de la substance intercanaliculaire. Ils sont tout à fait comparables à ceux qu'on observe dans les os fossiles (BAUD et MORGENTHALER, 1956); ce sont certainement des altérations post-mortem.

Les microradiographies montrent aussi diverses hétérogénéités dans la minéralisation de la dentine, correspondant aux microhypoplasies révélées par l'examen microscopique direct des coupes. Ces zones hypominéralisées apparaissent sous forme de dentine granuleuse ou aréolaire (Fig. 3) et plus rarement de dentine interglobulaire (Fig. 4); d'autre part, les lignes d'accroissement d'Owen (Fig. 5) sont souvent accentuées.

Émail

Les microhypoplasies de l'émail se présentent également dans les microradiographies comme des zones hypominéralisées. Les lignes d'accroissement de Retzius et les buissons (Fig. 6) sont fréquents, ainsi que les lamelles.

On observe aussi parfois des zones d'hypominéralisation, diffuse ou localisée, mais il n'est pas possible d'affirmer qu'elles se sont formées *in vivo*; elles ne sont pas entourées de couches hyperminéralisées.

DISCUSSION

Il est d'abord nécessaire de distinguer les altérations microscopiques qui peuvent être survenues après la mort, pendant le séjour dans le sol. Les canaux de forage et les zones d'hypominéralisation diffuse, déjà observés histologiquement par SOGNAES (1955), sont des altérations post-mortem. Les canaux de forage sont dus

à l'action de champignons microscopiques, qui ont été identifiés dans les os fossiles par MORGENTHALER et BAUD (1956). Les zones d'hypominéralisation ou de déminéralisation diffuse peuvent être logiquement rapportées, selon WERNER (1937), à l'action des acides du sol et des produits de dégradation des protéines.

Les taches localisées d'hypominéralisation de l'émail sont plus difficiles à interpréter; SOGNAES (1955) pense que leur genèse pourrait être liée à des conditions aérobiques locales post-mortem. Elles ne doivent pas être confondues avec des caries; les processus carieux s'accompagnent toujours de réactions biologiques (dentine réactionnelle, zone transparente); en se basant sur de tels critères, on ne constate que de très rares caries véritables dans les dents fossiles.

Les altérations post-mortem étant éliminées, il reste des inégalités de répartition des éléments minéraux dans la dentine et dans l'émail qui se sont certainement développées *in vivo*. Ces structures hypominéralisées correspondent exactement aux microhypoplasies que décèle l'observation microscopique des coupes de dents humaines fossiles, si bien que nos résultats basés sur les microradiographies confirment entièrement ceux de SOGNAES (1956) établis d'après les aspects histologiques, en les complétant par des données histochimiques sur le degré de minéralisation.

Ces microhypoplasies hypominéralisées sont très semblables également, aussi bien du point de vue qualitatif que du point de vue quantitatif, à celles que montrent les dents des hommes actuels (BAUD et HELD, 1956; HELD et BAUD, 1958). D'autre part il est bien connu que la fréquence des caries était beaucoup plus faible à l'époque néolithique et à l'âge du bronze qu'actuellement (WERNER, 1937; BROTHWELL, 1959). Mais les microhypoplasies se développent sous l'influence de facteurs divers (nutritionnels ou autres) intervenant pendant la période du développement, tandis que le facteur déterminant de la carie est uniquement lié à l'action locale des aliments. Les microhypoplasies ne joueraient donc de rôle, en favorisant le développement et l'extension du processus carieux, qu'à partir du moment où ce processus est amorcé, c'est à dire où il y a eu destruction de la partie périphérique de la dent.

Remerciements—Le Professeur M. SAUTER, Directeur de l'Institut d'Anthropologie de l'Université de Genève, a aimablement mis à notre disposition les dents humaines fossiles nécessaires pour nos investigations; nous l'en remercions vivement.

RÉFÉRENCES

- BAUD, C. A. et HELD, A. J. 1956. Silberfärbung, Röntgenmikrographie und Mineralgehalt der Zahnhartgewebe. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **11**, 309-314.
- BAUD, C. A. et MORGENTHALER, P. W. 1952. Recherches sur l'ultrastructure de l'os humain fossile. *Arch. suisses Anthropol. gén.* **17**, 52-65.
- BAUD, C. A. et MORGENTHALER, P. W. 1956. Recherches sur le degré de minéralisation de l'os humain fossile par la méthode microradiographique. *Arch. suisses Anthropol. gén.* **21**, 79-86.
- BAUD, C. A. et MORGENTHALER, P. W. 1959. Un microtome pour couper en série les tissus fortement minéralisés. *Bull. Micr. appl.* **9**, 101-102.
- BROTHWELL, D. R. 1959. Teeth in earlier human populations. *Proc. Nutr. Soc.* **18**, 59-65.
- HELD, A. J. et BAUD, C. A. 1958. Structure des tissus dentaires et pathogenèse de la carie dentaire. *Int. Z. Vitaminforsch. Suppl.* **7**, 23-51.
- MELLANBY, M. 1929. Diet and the teeth: an experimental study. Part I, dental structure in dogs. *Med. Res. Council, Spec. Rep. Ser.* No. 140. H.M. Stationery Office, London.

- MORGENTHALER, P. W. et BAUD, C. A. 1956. Sur une cause d'altération des structures dans l'os humain fossile. *Actes Soc. Helv. Sci. nat.* **136**, 142-143.
- SCHUMAN, E. L. et SOGNAES, R. F. 1956. Developmental microscopic defects in the teeth of subhuman primates. *Amer. J. phys. Anthropol.* **14**, 193-214.
- SOGNAES, R. F. 1955. Postmortem microscopic defects in the teeth of ancient man. *A.M.A. Arch. Path.* **59**, 559-570.
- SOGNAES, R. F. 1956. Histologic evidence of developmental lesions in teeth originating from paleolithic, prehistoric, and ancient man. *Amer. J. Path.* **32**, 547-577.
- WERNER, H. 1937. Scheinbare und wirkliche Karies an prähistorischen Zähnen. *Z. Rassenk.* **5**, 70-79.

STUDIES ON MINERALIZED DENTAL TISSUES—XV

MINERAL PATTERN OF DENTINE

G. BERGMAN, GERTRUD GÖTHE and E. WELANDER

The Royal School of Dentistry, Stockholm, Sweden

Abstract—In this investigation the following problems are treated:

1. Does any relation exist in the present Swedish material between caries and the mineral pattern of the dentine?
2. Do different types of teeth differ in their mineral pattern?
3. Does the mineral pattern of dentine vary on a geographical basis?
4. We have hoped to indicate normal values for the various types of mineral pattern in different primary teeth and in 6-year molars.

The analyses showed:

1. That no marked relation could be found between the extent of caries and the mineral pattern.
2. That different types of teeth showed great variations in respect of the extent of the types of mineral pattern. By using a standardized scale of marking, significant differences could be shown.
3. That a comparison between town and country showed a significant difference, mineralization disturbances being more common in the towns.
4. Normal values for mineral pattern of dentine from the present study are shown in Fig. 4.

Résumé—Les problèmes suivants ont été traités dans les présentes études:

1. Existe-t-il une relation quelconque dans le présent matériel Suédois entre la carie et la structure minérale de la dentine?
2. Est-ce que différents types de dents diffèrent par leur structure minérale?
3. Est-ce que la structure minérale de la dentine varie en relation avec les données géographiques?
4. Nous avons espéré d'indiquer des valeurs normales pour les différents types de structures minérales dans certaines dents de lait et molaires de 6 ans.

Les analyses démontrent:

1. Qu'il ne peut être établi aucune relation marquante entre l'étendue des caries et la structure minérale.
2. Que différents types de dents accusent d'importantes variations quant aux types de structures minérales. En utilisant une échelle standardisées d'indices, des différences significatives ont pu être observées.
3. Qu'une étude comparative entre la ville et la campagne a démontré une importante différence. Les perturbations dans la minéralisation sont plus communes dans les villes.
4. Des valeurs normales de la structure minérale de la dentine, extraites de la présente étude, sont montrées dans la Fig. 4.

Zusammenfassung—In dieser Untersuchung werden die folgenden Probleme behandelt:

1. Besteht in dem vorliegenden schwedischen Material irgendein Zusammenhang zwischen Karies und der anorganischen Struktur des Zahnbeines?

2. Sind verschiedene Arten von Zähnen in ihrer anorganischen Struktur ebenfalls verschieden?
3. Schwankt die anorganische Struktur des Zahnbeines mit den geographischen Gegebenheiten?
4. Wir hofften, normale Werte anzeigen zu können für die verschiedenen Arten von anorganischen Strukturen bei verschiedenen ersten Zähnen sowie bei 6-jährigen Backenzähnen.

Die Analysen ergaben folgendes:

1. Es konnte kein ausgeprägter Zusammenhang festgestellt werden zwischen dem Ausmass der Karies und der anorganischen Struktur.
2. Bei verschiedenen Arten von Zähnen zeigten sich grosse Schwankungen in Bezug auf den Umfang der Arten von anorganischen Strukturen. Unter Benutzung einer standardisierten Kennzeichnungsskala konnten bedeutsame Unterschiede gezeigt werden.
3. Ein Vergleich zwischen Stadt und Land zeigte einen bedeutenden Unterschied; Verkalkungsstörungen sind in den Städten häufiger.
4. Auf Abb. 4 werden Normalwerte für die anorganische Struktur des Zahnbeines aus der vorliegenden Studie gezeigt.

THE PRESENT INVESTIGATION may be regarded as a continuation of a health survey by WESTIN (1937) in which he studied the microscopic structure of the dental tissues in different areas of Sweden. He found a high incidence of disturbances, which he considered to be largely caused by deficiency of vitamins C and D. Like SWANSON (1931) he emphasized the importance of sunshine for the quality of the dental tissues and introduced the concepts of "summer and winter dentine".

MELLANBY (1934) and MASSLER and SCHOUR (1946) also made microscopic studies which are of interest from the point of view of public health. They found more pronounced mineralization disturbances in teeth from public than from private clinics.

These and other surveys of similar kind have been based on the sensitivity of the growing tooth to fluctuations in the body metabolism and on its ability to register chymographically the time of occurrence and the intensity of various general disturbances (SCHOUR, 1937). It must be remembered, however, that the structural changes which take place while the teeth are still growing are usually non-specific and that, for example, enamel hypoplasia, enamel hypomineralizations, accentuated incremental lines, interglobular dentine and broad predentine zones may be caused by a wide variety of factors.

In the earlier literature the main interest lay in the enamel hypoplasias, which were readily observable clinically, and in their real or supposed relationship to rickets, spasmophilia, syphilis, meningitis, nutritional deficiency, measles, whooping cough, diphtheria and other diseases of infancy (see papers by WALKHOFF (1895) and BERTEN (1895) and textbooks by KRONFELD (1949), STONES (1948) and THOMA (1950)). Following the discovery of the neonatal line in enamel and dentine it became definitely established that even microscopic changes can have an important biological significance (RUSHTON, 1933; SCHOUR, 1936).

Disturbances during dental growth usually leave their mark on the enamel and dentine alike, and both these tissues can be used as biological indicators. According to WESTIN (1937) the dentine is more sensitive than the enamel, whereas SCHOUR and MASSLER (1940) hold the contrary view. There seems to be agreement, however, that

the dentine offers better possibilities for objective recording of the changes and, consequently, for statistical analysis. The difficulty of recording structural variations in the enamel is clearly apparent from earlier investigations (MELLANBY, 1934; MASSLER and SCHOUR, 1946), probably on account of the great individual variations (GUSTAFSON, 1959).

For these reasons the assessment of microscopic structure in the present study has been confined to the dentine. The enamel will be considered in a later paper when proper methods have been elaborated for its evaluation.

The classical basis for the microscopic assessment of the quality of dentine has been its tendency to globular mineralization as a result of disturbances of different kinds. In numerous animal experiments it has been shown that the greater the severity of an experimental lesion, the more pronounced usually is the globular mineralization. This dentine reaction is, as already stated, non-specific and may occur in experimental conditions as different as fluorosis (SCHOUR and SMITH, 1934, 1935; WESTIN, 1935), vitamin A deficiency (WOLBACH and HOWE, 1933), vitamin D deficiency (FLEISCHMANN, 1910; ERDHEIM, 1914), hypoparathyroidism (ERDHEIM, 1906; SCHOUR, CHANDLER and TWEEDY, 1937), lathyrisms (GARDNER, 1959) and artificially induced fever (KITCHIN and BERMAN, 1940).

When changes of this type have been encountered in human teeth, vitamin D deficiency has usually been regarded as an important factor (TOVERUD and TOVERUD, 1931; MELLANBY, 1934; WESTIN, 1937; SARNAT and SCHOUR, 1941-1942), but other deficiency conditions as well have been discussed. SHELDON, BIBBY and BALES (1945), who examined sections of teeth from thirty-four individuals for enamel hypoplasia and interglobular dentine, considered that deficiencies of vitamins A, C and D, and of calcium and phosphorus, were the main factors and, "compared with nutritional deficiencies, the exanthemata play only a minor part . . ." Investigations by A.-G. GUSTAFSON (personal communication) indicate that no changes due to fluorosis occur in human dentine when the fluorine content of the drinking water is of the order of magnitude as that in Sweden.

Of particular interest for the present study is that the parts of the hard dental tissues which are formed and mineralized before birth show "almost perfect calcification even in cases when the maternal diet was known to be deficient" (MASSLER and SCHOUR, 1946). The relative stability of the prenatal tissue has been observed by other authors as well (MELLANBY, 1927, 1934; KRONFELD and SCHOUR, 1939) and appears to render it unsuitable as biological indicator. The first ten months of life, on the other hand, seem to be a period of sensitivity to disturbances. In the opinion of MASSLER and SCHOUR (1946) this sensitivity is associated with the "change from the parasitic intrauterine existence to the more independent and traumatic postnatal type of life". The hard tissue formed during this period may therefore prove a more sensitive indicator; this is of great significance for the present study, which is concerned chiefly with the milk teeth, the crowns of which are formed largely during the first year of life.

Opinions on the relationship between tooth structure and caries are very varying. BLACK (1895) maintained that "neither structure nor chemical composition is in any

degree a factor in predisposing the teeth to caries, or in hindering its inception or progress". Similar views have been expressed by many other authors, e.g. BUNTING (1939), BUNTING and HILL (1940), COLYER and SPRAWSON (1938), MACKAY and ROSE (1931), ROSEBURY (1938), STAZ (1943) and WESTIN (1937).

Some investigators, on the contrary, see a direct relationship between quality of tooth structure and caries. The supply, in particular, of fat-soluble vitamins, especially of vitamin D, during dental growth, has been claimed as an essential factor in protecting against caries (TOVERUD and TOVERUD, 1931; MELLANBY, 1934; MELLANBY, 1940; MELLANBY and MELLANBY, 1954).

At the present stage of our investigation we have, as already stated, confined our assessment of the quality of the dental tissues to the dentine, studied on decalcified and stained sections. We have classified the type of mineralization as smooth, globular or interglobular. The degree of mineralization, determined by quantitative microradiography, will be dealt with in a later publication. It is important to make a distinction between type and degree of mineralization, which does not always appear clearly from the literature. An example is a statement by MASSLER, SCHOUR and PONCHER (1941), repeated by MASSLER and SCHOUR (1946), that the mantle dentine (the surface dentine) is "very well calcified" or has "a perfect calcification".

These authors have manifestly based their opinion on decalcified and haematoxylin-stained sections in which the mantle dentine regularly exhibits a smooth type of mineralization. Our microradiographic studies of ground sections, however, show that the part of the dentine adjoining the enamel usually has a lower degree of mineralization than the underlying dentine areas. In this special case a smooth type of mineralization obviously corresponds to a low degree of mineralization.

COLLECTION OF MATERIAL

The most convenient points for collection of extraction material were considered to be the Public Dental Clinics. A list of these clinics within different regions was obtained from the Dental Section of the National Board of Health. From this list a selection was made first of the clinics in the larger cities and then, from the remainder, of each fifth clinic. In Stockholm and Gothenburg each fifth School Dental Clinic was likewise selected.

A communication was addressed to the superintendents of the selected clinics, in which the procedure for collection was specified as follows:

1. Children aged 6, 7 and 8 years, whose surname starts with A or B, to be registered, examined and treated.
2. The material to consist of one extracted tooth from each child aged 6, 7 or 8 years selected as stated above. If more than one tooth is to be extracted from any of these children, the least damaged tooth shall be selected. It makes no difference whether the extracted tooth is a deciduous or permanent tooth (6-year molar). If 6-year molars as well as milk teeth are to be extracted, one milk tooth and one 6-year molar shall be selected.
3. Immediately after extraction the teeth shall be placed in the accompanying bottles containing formalin solution.

The collection of material proceeded during the months of October and November, 1956.

It must be said that the number of extracted teeth received from certain clinics was remarkably small. This can be mainly explained by the varying indications for extraction from one region to another and sometimes even within the same region. Another factor was that the treatment of the selected age groups had been almost completed at certain places.

Of the 1542 teeth collected, 139 milk teeth and twenty first molars were selected for detailed study of the relation between caries and mineralization pattern. The breakdown by collection area and type of caries is shown in Table 4.

METHODS

Immediately after extraction the teeth were fixed in neutral buffered formalin by the method of LILLIE (1953). The 159 teeth for histological examination were then cut into two halves longitudinally with a diamond wheel. On the molars the cut was made mesio-distally, on incisors and canines labio-lingually. Each half-tooth was sketched, and caries, fillings and other characteristics were recorded. One half was embedded in methyl methacrylate and a section was ground to a thickness of roughly 100 μ . The ground section was examined microradiographically for qualitative and quantitative assessment of the mineral distribution in the hard tissues. A detailed description of the method will be given in a later publication.

The other half of the tooth was decalcified, embedded in paraffin, cut into 5 μ sections, and stained with Mayer's haemalum-eosin and with Bock's calcium stain. Thirty serial sections, which were calculated to be parallel to the ground section and about 1 mm from it, were made from each half-tooth. In most cases 5% nitric acid was used as decalcifying solution. Decalcification in EDTA, hydrochloric acid, trichloroacetic acid and formic acid was also tried in some cases. Two decalcified sections from each tooth were set aside for examination with ultra-soft X-rays. The application of the method to dental tissue was described by BERGMAN (1957).

The teeth were divided into three caries classes:

- Class I. No clinically observable loss of substance referable to caries.
- Class II. Manifest loss of substance due to caries, but restricted to the enamel and to the outer layer of the dentine (cavities usually of small area as well).
- Class III. Large carious cavities both in area and depth.

For assessing the mineral pattern of the dentine, we used a system of grading essentially similar to that employed by earlier investigators (MELLANBY, 1934; MASSLER and SCHOUR, 1946). Our three grades were as follows:

- A. Smooth type of mineralization (Fig. 1).
- B. Globular type of mineralization with connected globuli (Fig. 2).
- C. Interglobular type of mineralization with free globuli (Fig. 3).

With the stains used by us, mineral globuli appear as rounded bluish-violet areas which sometimes flow together within parts of the dentine so that the globular structure is no longer visible. Scattered globuli have long been regarded as a sign of disturbed mineralization, packed or confluent globuli as the mark of high quality dentine.

MINERAL PATTERN OF DENTINE

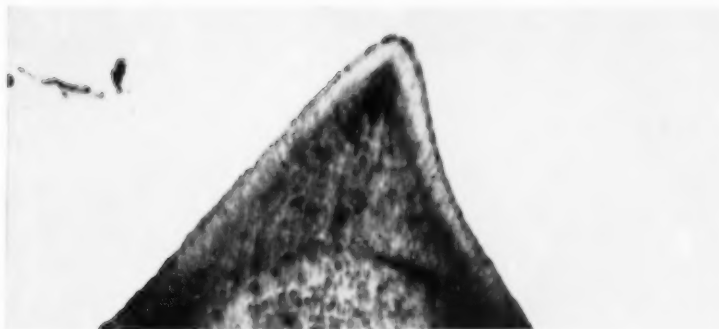


FIG. 1. Type A. $\times 60$.

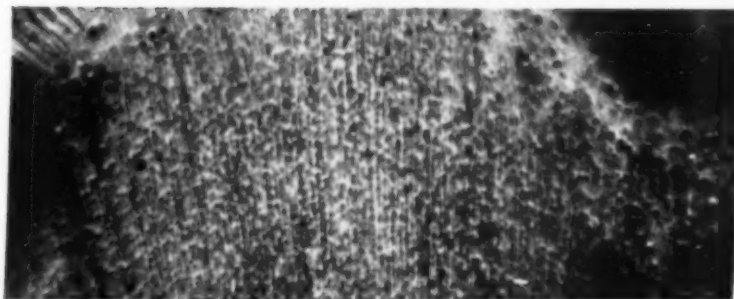


FIG. 2. Type B. $\times 60$.

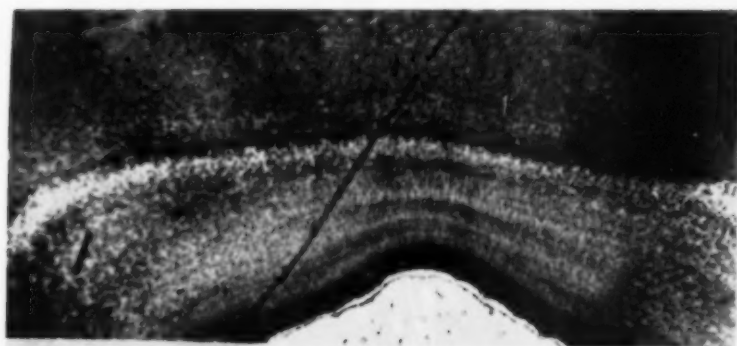


FIG. 3. Band of Type C. $\times 45$.

1. The first part of the book is a general introduction to the study of the history of the United States.

Vol.
4
1961

(This system of grading does not make use of the presence of accentuated incremental lines for assessing the quality of the dentine. The reason is that such lines seem to occur erratically in this material and are difficult to record objectively.)

In addition to the qualitative assessment we made a quantitative estimate of the extent of mineralization in the crowns. In the latter assessment, we originally intended to take into account the chronological formation of the dentine and therefore divided the crowns into sections, the boundaries of which were parallel with the growth lines of the dentine.

There were certain practical difficulties, however, in this sectionalization. In some cases a band of Type B might pass at right angles over the sectional boundaries through the entire crown, which in other respects exhibited mineralization of Type A. In other cases the greater part of the crown might show mineralization Type B, while a band of Type A passed through the sections without regard for the chronological structure. It will be readily realized that it was difficult to grade a section correctly in cases of this kind. For the present, therefore, we are using a simpler system for estimating the extent of mineralization:

- A. Entire crown shows mineralization Type A
- B¹. Max. 1/3 of crown Type B (rest Type A)
- B². Max. 2/3 of crown Type B (rest Type A)
- B³. Above 2/3 of crown Type B (rest Type A)
- C¹. Max. 1/3 of crown Type C (pattern of dentine in other respects ignored)
- C². Max. 2/3 of crown Type C (pattern of dentine in other respects ignored)
- C³. Above 2/3 of crown Type C (pattern of dentine in other respects ignored)

To test the method of recording, two persons (A and B) made duplicate determinations on a large part of the material. The result of these determinations is shown in Table I.

It will be seen that the agreement is not complete but may be regarded as satisfactory since the deviations are qualitative only in exceptional cases and only in a few cases exceed one grade quantitatively.

TABLE I. DUPLICATE DETERMINATIONS OF MINERALIZATION PATTERN IN NINETY-EIGHT TEETH

Class	Complete agreement (No. cases)	Deviation (No. cases)
I	19	9
II	25	9
III	28	8

PROBLEMS REQUIRING SOLUTION

Through the material here presented we have attempted to find answers to the following four questions:

1. Does any relation exist in the present Swedish material between caries and the mineral pattern of the dentine? Only if no such relation is found would there

be reason to consider whether the mineral pattern in the teeth studied can be regarded as representative for Swedish children, i.e. whether the teeth present what we call normal values (cf. Question 4).

It is stated in the literature that a relation does exist between caries and mineral pattern. Even if such a relation exists, there is a danger that the present material would fail to bring it to light owing to the insignificant extent of mineralization disturbances.

2. Do different types of teeth differ in their mineral pattern? This question is of interest, among other reasons, because different types of teeth develop to a different extent before and after birth. In the deciduous central incisors (01)* the greater part of the crown is formed before birth, but in the deciduous second molars (05) after birth.
3. One may also wonder whether the mineral pattern of dentine varies on a geographical basis. This question is of interest in view of the statement by WESTIN (1937) that the children in the north of Sweden are worse placed than those in the south. There is some interest, too, in investigating where any difference of mineral pattern exists between town and country children.
4. We have wished to indicate normal values for the various types of mineralization in different milk teeth and in 6-year molars. One reason for our interest in normal values is that they would permit comparison with other teeth and with future Swedish material. As already stated, the present material has come entirely from public clinics. The majority of the teeth submitted had been extracted for caries. This makes it extremely doubtful whether the resulting values can be regarded as normal. In order to answer this question, it was necessary to consider Question 1.

We shall start by considering the question of the relation between caries and mineral pattern since it has a significant bearing on the answers to the remaining questions.

1. *Relation between caries and mineral pattern of dentine*

Table 2 shows the breakdown of 130 of the teeth into caries classes and mineralization types. Only eight of the 130 teeth (6 per cent) showed the "best" mineralization Type A, and nine teeth (7 per cent) the "worst" Type C. The use of only 130 teeth in this context as against 159 previously is due to the principle of selection employed for study of this question.

The incidence of mineralization disturbances (Types B and C) in teeth with heavy carious attack (Class III) is higher than in caries-free teeth (Class I). The worst Type (C) occurs more frequently in Class III than in Class I.

The difference shown above is partly explained by Table 3, in which caries-free deciduous and permanent molars are poorly represented and show a high incidence of mineralization disturbance. Incisors and canines are in most cases caries-free, and some of them show the best mineralization type. None of these three types of teeth has the worst mineralization Type C.

* The deciduous teeth are denoted by placing a zero before the numeral.

TABLE 2. CARIES AND THE MINERAL PATTERN OF THE DENTINE

Caries class	Mineralization type							No. of teeth	% A	% B	% C
	A	B ¹	B ²	B ³	C ¹	C ²	C ³				
I	5	5	8	12	1			31	16	81	3
II	2	12	18	16	1	1		50	4	92	4
III	1	5	11	26	5	1		49	2	86	12
Total	8	22	37	54	7	2		130	6	87	7

TABLE 3. CARIES AND MINERALIZATION PATTERN IN DIFFERENT TYPES OF TEETH

Tooth type	Class	A	B ¹	B ²	B ³	C ¹	C ²	C ³
01	I	1	3	1	2			
	II+III	3	4					
02	I	2	1					
	II+III	3	2					
03	I	2	1	6	9			
	II+III		8	7	2			
04	I			1	1			
	II	2	4	9	7	1		
05	III		3	4	5	1		
	I+II			3	15	2	2	
6	III			2	15	4	1	
	I+II		2	6	4			
	III		1	2	3	2		

Table 3 shows the differences between caries-free and carious teeth with respect to mineral pattern. As regards the front teeth (01) mineralization Type B occurs more often among the caries-free.

No difference is observable between caries-free and carious deciduous cuspids (03). Among the deciduous first molars (04) there were so few caries-free teeth, that it is almost impossible to decide whether they have a different mineral pattern. If we consider Classes I and II as a group and compare it with Class III, we find that the differences are slight. Nor are there any notable differences in the deciduous second molars (05). For the first permanent molar (6) there seems to be some suspicion of a greater frequency of mineralization Type C in the strongly carious teeth. As a whole, however, we may say that no marked differences in mineral pattern occur between caries-free and carious teeth. Therefore, as a first assumption at all events, we may lump together the caries-free and carious teeth; and we may take it for the present that our material has not been biased as a result of the caries situation—that is to say, the most important indication for extraction of the teeth would not introduce a bias into the composition of the material as regards mineral pattern as characterized by us.

Accordingly, if each type of tooth is studied separately, no marked relation is found between the extent of caries attack and the mineral pattern. The relation shown in Table 2 probably resulted from the fact that different types of teeth carry different caries risks. On the assumption that there is no relation between caries and mineral pattern, the data on mineral pattern revealed by the present material may be considered representative of teeth extracted at the sampled clinics; and since the clinics were selected at random, they may be considered representative of Swedish dental clinics as a whole. This is not to say that the figures can be considered representative of all milk teeth within the sampling areas of the clinics. It might be thought that most of the children visiting the clinics come from a certain social stratum. There is little ground for such suspicion, however, since dental care extends to practically all schoolchildren of these ages.

2. Do different types of teeth differ in their mineral pattern?

The number of cases observed with different types of mineralization and the distribution for each of the deciduous teeth and permanent first molars is shown in Fig. 4. It will be seen that 01 and 02 show a very much higher incidence of Type A than the remaining teeth. For 05 and 6, on the other hand, the material contains no case of Type A. The worst type (C) occurs principally in 05, to some extent in 04 and 6, but not at all in 01, 02 and 03. Type B³ is heavily represented among the deciduous second molars, but very seldom occurs in the incisors.

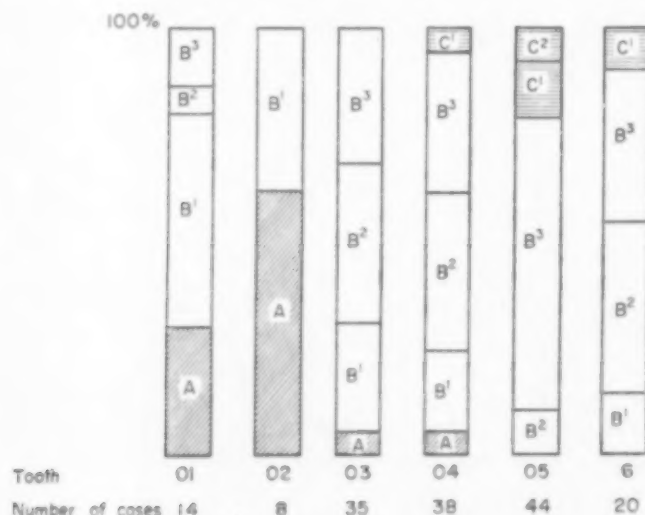


FIG. 4. Mineralization pattern for different types of teeth.

The following analysis is aimed at discovering whether the differences revealed by Fig. 4 can have come about by pure chance. Our reasoning here is that the teeth recorded can be denoted as a random selection from the teeth extracted at the clinics

during the period under consideration. By using a standardized scale of marking—a, b and c, as set out in Table 5—the following analyses can be made:

- (a) Is there any pronounced difference between the six teeth as regards incidence of Type A? Here we may compare the early mineralized teeth 01 and 02 with the late mineralized 05 and 6. Of the twenty-two anteriors nine are of Type A, and of the sixty-four posteriors none is of Type A. This difference is clearly significant. Teeth 03 and 04 are in an intermediate position, four cases of Type A having been observed out of a total of seventy-three.
- (b) We consider the following variable which characterizes the extent of the various mineralization types. The quantification implies that we introduce the variable 0 for Type A, 1 for Type B¹, 2 for Type B², and 3 for Types B³, C¹, C² and C³. For the variable so constructed we find the following mean values:

01 =	1.07
02 =	0.38
03 =	1.94
04 =	2.11
05 =	2.89
6 =	2.30

Here again there is a significant difference between the two posterior teeth and the anterior teeth, while 03 and 04 occupy an intermediate position. This intermediate group differs significantly from both anterior and posterior teeth.

- (c) Here the following quantification has been performed:

Type A = 0, Type B = 1, Type C = 2.

The mean values for the different teeth are:

01 =	0.71
02 =	0.38
03 =	0.94
04 =	1.00
05 =	1.20
6 =	1.10

The difference between anterior and posterior teeth is again strongly significant. A significant difference also exists between, on the one hand, 01 and 02 and, on the other, 03 and 04. Between 01 and 02 the variables show no significant difference, nor between 03 and 04.

3. Mineral pattern of dentine in different geographical areas

In our selection of teeth for study of the mineral pattern we have ensured that the different caries classes within each sampling area have been represented by roughly equal numbers of teeth. For this reason some areas had to be excluded.

Table 4 shows the incidence of different mineralization types and caries classes within the various sampling areas. The table cannot be used for direct comparison of the figures from the various areas (counties) since it does not give the breakdown by type of tooth and, as revealed by Table 3, the different teeth differ in their mineralization pattern.

TABLE 4. CARIES, MINERAL PATTERN, AND GEOGRAPHICAL ENVIRONMENT

Sampling area	Caries class	Mineralization types						
		A	B ¹	B ²	B ³	C ¹	C ²	C ³
1. Stockholms län	I II III	1		1				
2. Uppsala län	I II III		2	1 1	1 1			
3. Södermanlands län	I II III			1	1			
4. Östergötlands län	I II III	1	2	1	2 2			
5. Värmlands län	I II III			1	1	1	1	
6. Västmanlands län	I II III				1	1		
7. Kopparbergs län	I II III	1	1					
8. Gävleborgs län	I II III			1	2 2	1		
9. Västernorrlands län	I II III						1	
10. Malmöhus läns	I II III	1		1 1	3		1	
11. Göteborgs Bohus län	I II III	1	1	1	1			
12. Älvsborgs län	I II III	1	1	2 1	1 3	1	1	
13. Jämtlands län	I II III			1	1			
14. Norrbottens län	I II III		1	2 2 2	3 1 1	1		
15. Göteborgs stad	I II III		5 1	3 3	2 5	1		
16. Norrköpings stad	I II III			1	1			
17. Stockholms stad	I II III			1	2 3			
18. Jönköpings stad	I II III	1	2 1 2	1 6 3	2 1 8	1 2		
19. Kalmar stad	I II III				1 2	1		
20. Kristianstads län	I II III		1 1	1	1			

TABLE 5. NUMBER OF INDIVIDUALS WITH DIFFERENT MINERALIZATION PATTERNS IN RELATION TO TOOTH TYPES AND STANDARD SCALES

Mineralization pattern	A	B ¹	B ²	B ³	C ¹	C ²	C ³	A vs. B + C				Extent				Mineralization type			
								Mean value		x		Mean value		y		Mean value		z	
								a	b	0	1	2	2	0	1	2	0	1	2
a A vs. B + C	0	1	1	1	1	1	1	10/14	15/14	-15/14	-1/14	13/14	27/14	-10/14	4/14	18/14	-10/14	4/14	18/14
b Extent	0	1	2	3	3	3	3	3/8	3/8	-3/8	5/8	13/8	21/8	-3/8	5/8	13/8	-3/8	5/8	13/8
c Mineralization type	0	1	1	1	1	2	2	33/35	68/35	-68/35	-33/35	2/35	37/35	-33/35	2/35	37/35	-33/35	2/35	37/35
Tooth type	Number of individuals							Mean value		x		Mean value		y		Mean value		z	
01	4	7	1	2				10/14	15/14	-10/14	4/14	13/14	27/14	-10/14	4/14	18/14	-10/14	4/14	18/14
02	5	3						3/8	3/8	-3/8	5/8	13/8	21/8	-3/8	5/8	13/8	-3/8	5/8	13/8
03	2	9	13	11				33/35	68/35	-68/35	-33/35	2/35	37/35	-33/35	2/35	37/35	-33/35	2/35	37/35
04	2	7	14	13	2			36/38	80/38	-80/38	-4/38	34/38	5/44	-39/44	5/44	53/44	-39/44	5/44	53/44
05			5	30	6	3		1	127/44	-127/44	-83/44	-39/44	5/44	-39/44	5/44	53/44	-39/44	5/44	53/44
6		3	8	7	2			1	46/20	-46/20	-26/20	-6/20	14/20	-22/20	-2/20	18/20	-22/20	-2/20	18/20

In order to be able to make a comparison between the various areas, quantification has been necessary by allotting to each tooth its own scale. The object of this comparison has been:

- Firstly, to compare A with B plus C, i.e. teeth free from mineralization disturbance with teeth in which mineralization disturbance exists.
- Secondly, to illustrate the extent of mineralization disturbances. The value 0 has been allotted to Type A, 1 to B¹, 2 to B², and 3 to Types B³, C¹, C² and C³.
- Thirdly, to illustrate the "quality" of mineralization disturbance. A has been equated with 0, B with 1, and C with 2.

From these scales the mean for each tooth was then calculated. We find for A, for example, that tooth 01 has the mean value 10/14. The mean values are shown in Table 5. The next step was to compare teeth of different kinds. For this purpose every tooth was allotted a number so chosen that the mean value of the new numbers will be zero. For scale *a* the resulting variable has been denoted by *x*, for scale *b* by *y*, and for scale *c* by *z*. The conversion of the values in scales *a*, *b* and *c* to the variables *x*, *y* and *z* is also apparent from Table 5.

These new variables *x*, *y* and *z* have then been substituted for the original notations in Table 4 after insertion of the tooth number. In this way Table 4 has been replaced by Table 6, which shows *a*, *b* and *c*, and *x*, *y* and *z*, for each area. A variance analysis has then been made of the variables *x*, *y* and *z* to see whether any difference exists between the various sampling areas. This analysis was made by means of the *F*-test (HALD, 1948).

The object of the *F*-test is to find out whether the differences between the means for the various areas are of such order of magnitude that they cannot be explained in terms of pure chance.

TABLE 6. (OBSERVER A)

		<i>a</i>	<i>x</i>	<i>b</i>	<i>y</i>	<i>c</i>	<i>z</i>
Stockholms län	04	0	-95	0	-211	0	-100
	04	1	5	3	89	1	0
	05	1	0	2	-89	1	-20
Uppsala län	01	1	29	1	-7	1	29
	03	1	6	1	-94	1	6
	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	2	-11	1	0
	05	1	0	2	-89	1	-20
Södermanlands län	05	1	0	2	-89	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
Östergötlands län	03	0	-94	0	-194	0	-94
	03	1	6	1	-94	1	6
	03	1	6	3	106	1	6
	03	1	6	3	106	1	6
	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	05	1	0	3	11	1	-20
	6	1	0	1	-130	1	-10
Värmlands län	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	3	89	2	100
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	2	80
Västmanlands län	05	1	0	3	11	1	-20
	6	1	0	3	70	2	90
Kopparbergs län	02	0	-38	0	-38	0	-38
	04	1	5	1	-111	1	0
Gävleborgs län	03	1	6	3	106	1	6
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	2	80
	6	1	0	2	-30	1	-10
	6	1	0	3	70	1	-10
	6	1	0	3	70	1	-10
Västernorrlands län	05	1	0	3	11	2	80

TABLE 6. (OBSERVER A)—contd.

		a	x	b	y	c	z
Malmöhus län	01	0	-71	0	-107	0	-71
	04	1	5	1	-111	1	0
	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	05	1	0	2	-89	1	-20
	05	1	0	2	-89	1	-20
	05	1	0	2	-89	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
Kristianstads län	01	1	29	2	93	1	29
	04	1	5	1	-111	1	0
	05	1	0	1	-189	1	-20
	6	1	0	3	70	1	-10
Bohus län	01	1	29	1	-7	1	29
	04	0	-95	0	-211	0	-100
	05	1	0	2	-89	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
Älvsborgs-län	01	0	-71	0	-107	0	-71
	03	0	-94	0	-194	0	-94
	03	1	6	1	-94	1	6
	03	1	6	2	6	1	6
	03	1	6	2	6	1	6
	03	1	6	2	6	1	6
	03	1	6	3	106	1	6
	04	1	5	3	-11	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	2	-80
	05	1	0	3	11	2	-80
	05	1	0	3	11	2	-80
Norrbottnens län	01	1	29	1	-7	1	29
	05	1	0	2	-89	1	-20
	05	1	0	2	-89	1	-20
	6	1	0	2	-30	1	-10
	6	1	0	2	-30	1	-10
	6	1	0	2	-30	1	-10
	6	1	0	2	-30	1	-10
	6	1	0	2	-30	1	-10
	6	1	0	3	70	1	-10
	6	1	0	3	70	1	-10
	6	1	0	3	70	1	-10
	6	1	0	3	70	2	-90
Stockholms stad	03	1	6	2	6	1	6
	04	1	5	3	89	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
Jämtlands län	04	1	5	2	-11	1	0
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
Göteborgs stad	03	1	6	1	-94	1	6
	03	1	6	1	-94	1	6
	03	1	6	2	6	1	6
	03	1	6	2	6	1	6
	03	1	6	2	6	1	6
	03	1	6	2	6	1	6
	03	1	6	2	6	1	6
	03	1	6	3	106	1	6
	03	1	6	3	106	1	6
	03	1	6	3	106	1	6
	04	1	5	1	-111	1	0
	04	1	5	1	-111	1	0
	04	1	5	1	-111	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
Norrköpings stad	04	1	5	2	-11	1	0
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	2	-80
Jönköpings stad	01	1	29	1	-7	1	29
	01	1	29	3	193	1	29
	01	1	29	3	193	1	29
	02	0	-38	0	-38	0	-38
	02	1	63	1	63	1	63
	03	1	6	2	6	1	6
	04	1	5	1	-111	1	0
	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	2	-11	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	04	1	5	3	89	1	0
	05	1	0	1	-189	1	-20
Kalmar stad	05	1	0	2	-89	1	-20
	05	1	0	2	-89	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	1	-20
	05	1	0	3	11	2	-80
	05	1	0	3	11	2	-80
	05	1	0	3	11	2	-80
	05	1	0	3	11	2	-80

As already stated, the assessment was made by two observers (A and B), A having assessed the entire material and B considerably more than half of the material. The variance analyses are shown in Table 7A and 7B.

Whereas Observer A shows hardly any tendency to inter-regional variations, Observer B found nearly significant differences for variables *x*, *y* and *z*. In the

TABLE 7A. VARIANCE ANALYSIS OF MATERIAL FROM TABLE 6

Cause of variation	F.g.	x		y		z	
		Square totals	Mean square	Square totals	Mean square	Square totals	Mean square
Between regions	20-1	8,373	440.68	117,400	6178.9	32,322	1701.16
Within regions	128	51,989	406.16	767,558	5996.5	151,264	1103.62
Total	148-1	60,362	$F=1.08$	884,958	$F=1.03$	173,586	$F=1.54$
Between types of locality	1	2360.2	2360.2	20,622	20,622	1444	1444
Between regions within different types of locality	18	6013	334	96,778	5376	30,878	1715
Within regions	128	51,989	406.16	767,558	5996.5	141,264	1103.6
Total	147	60,362	$F=5.81^*$	884,958	$F=3.44$	173,586	$F=1.31$

TABLE 7B. VARIANCE ANALYSIS OF THE MATERIAL RECORDED BY B

Cause of variation	F.g.	Square totals	Mean square	Square totals	Mean square	Square totals	Mean square
Between regions	19-1	17,660	981	179,493	9971.8	47,358	2631
Within regions	80	39,227	490.3	383,198	4790	87,528	1094.1
Total	99-1	56,888	$F=2.00^*$	562,691	$F=2.08^*$	134,886	$F=2.40^{**}$
Between types of locality (town vs. country)	1	4900	4900	74,235	74,235	4656	4656
Between regions within different types of locality	17	12,760	750.6	105,258	6191.6	42,702	2511.9
Within regions	80	39,227	490.3	383,198	4790	87,528	1094.1
Total	98	56,888	$F=9.99^{**}$	562,691	$F=15.50^{**}$	134,886	$F=4.25^*$

comparison between towns and country Observer A has nearly significant differences for variable x, while Observer B has significant differences for variables x, y and z. These variations imply that the worse types of mineralization are more frequent in the towns, whether we consider variable x, y or z. As regards the inter-regional variations, the significant differences found by Observer B can be largely explained as variations between types of locality (towns vs. country). Only for variable z is there a significant difference which cannot be explained in terms of type of locality ($F=2512/1094$).

This inter-regional variation is due to the high values in certain areas such as Västernorrland, Värmland and Kristianstad, whereas Bohuslän, Östergötland and

Kopparberg have low values. High values correspond to an abundance of the worse types of mineralization.

In conclusion it may be said that certain differences have been found between the different types of locality. A comparison between the towns of Stockholm, Gothenburg, Norrköping, Kalmar and Jönköping, and the remaining localities, consisting essentially of rural districts, shows a significant difference for variable x , mineralization disturbances being more common in the towns.

In the presentation of the normal figures it has been necessary to make a breakdown by type of tooth. A breakdown including tooth type and town vs. country has not been made, however, despite certain differences between them. If the material had been more extensive, a breakdown on these lines would have been natural.

It is striking that certain differences appear clearly in the figures of one observer, but not in those of the other. We therefore intend to arrange for a new assessment by a larger number of observers on the basis of the present material.

4. Normal values for mineralization pattern of dentine

Fig. 4, which is based on Table 3, shows the normal values resulting from the present study. The table shows the number of cases with different types of mineralization for teeth 01-05 and 6, with the corresponding percentages shown in Fig. 4. It should be noted that these normal values must be regarded as representative chiefly of teeth extracted at the dental clinics. We also know that the teeth come mostly from schoolchildren, 16 per cent aged 6 years, 52 per cent 7 years, and 31 per cent 8 years. One may ask whether the material includes teeth with mineralization damage which is visible on the enamel, but this has not been the case. There is therefore no reason to suspect that teeth with mineralization damage in the enamel have been extracted on account of such damage. Nor need it be feared that any extensive retention sites have arisen as a result of such damage.

Serious mineralization disturbances (C) occurred only on molars. Nearly half of the incisors, but only a few of the remaining teeth, were completely free from disturbance (A). The deciduous second molars (05) would seem to be most susceptible to damage; note that 20 per cent of the cases were Type C and 70 per cent Type B³. It must be emphasized, however, that the limited size of the material leads to considerable uncertainty as regards the percentages.

REFERENCES

- BERGMAN, G. 1957. Studies on mineralized dental tissues—XI. *Odont. Revy* 8, 143-153.
- BERTEN, J. 1895. Hypoplasie des Schmelzes. *Dtsch. Mschr. Zahnheilk.* 13, 425-439, 483-498, 533-548, 587-600.
- BLACK, G. V. 1895. An investigation of the physical characters of the human teeth in relation to their diseases, and to practical dental operation, together with the physical characters of filling-materials. *Dent. Cosmos* 37, 353-421.
- BUNTING, R. W. 1939. What procedures can be instituted in the infant and preschool life of the child for the prevention and control of dental caries? *J. Amer. dent. Ass.* 26, 375-378.
- BUNTING, R. W. and HILL, T. J. 1940. *A Textbook of Oral Pathology* (2nd Ed.). Lea & Febiger, Philadelphia.

- COLYER, J. F. and SPRAWSON, E. 1938. *Dental Surgery and Pathology* (7th Ed.). Longmans Green, London.
- ERDHEIM, J. 1906. Tetania Parathyreopriva. *Mitt. Grenzgeb. Med. Chir.* **16**, 632.
- ERDHEIM, J. 1914. Rachitis und Epithelkörperchen. *Denkschr. Akad. Wiss. Wien* **90**, 363.
- FLEISCHMANN, L. 1910. Rachitische Veränderungen des Dentins. *Ost.-Ung. Vjschr. Zahnheilk.* **26**, 11.
- GARDNER, A. F. 1959. Studies in calcification during experimental lathyrisms. *J. Canad. dent. Ass.* **25**, 561-575.
- GUSTAFSON, A.-G. 1959. A morphologic investigation of certain variations in the structure and mineralization of human dental enamel. Berlingska boktryckeriet, Lund.
- HALD, A. 1948. Statistiska metoder. Köpenhamn.
- KITCHIN, P. C. and BERMAN, M. 1940. Dicalcium phosphate and cod-liver oil as factors in prevention of dentin hypocalcia resulting from artificially induced fevers. *J. dent. Res.* **19**, 505-510.
- KRONFELD, B. D. 1949. *Kronfeld's Histopathology of the Teeth and their Surrounding Structures* (3rd Ed.), Edited by P. E. BOYLE. Lea & Febiger, Philadelphia.
- KRONFELD, R. and SCHOUR, I. 1939. Neonatal dental hypoplasia. *J. Amer. dent. Ass.* **26**, 18-32.
- LILLIE, R. D. 1953. *Histopathologic Technic*. The Blakiston Company, New York.
- MACKAY, H. and ROSE, S. F. 1931. Vitamin D deficiency, dental caries and tonsillar enlargement. *Lancet* 1931ii, 1230.
- MASSLER, M., SCHOUR, I. and PONCHER, H. G. 1941. Developmental pattern of the child as reflected in the calcification pattern of the teeth. *Amer. J. Dis. Child.* **62**, 33.
- MASSLER, M. and SCHOUR, I. 1946. Growth of the child and the calcification pattern of the teeth. *Amer. J. Orthodont.* **32**, 495-516.
- MELLANBY, M. 1927. The structure of human teeth. *Brit. dent. J.* **48**, 737-751.
- MELLANBY, M. 1934. *Diet and the Teeth. An Experimental Study, Part III. The Effect of Diet on Dental Structure and Disease in Man*. Medical Research Council Special Report Series, No. 191. H.M.S.O., London.
- MELLANBY, H. 1940. Dental hypoplasia and caries among the children of Finnish Lapps. *Brit. med. J.* 1940i, 682-686.
- MELLANBY, M. and MELLANBY, H. 1954. Dental structure and caries in 5-year-old children attending L.C.C. schools (1949 and 1951). *Brit. med. J.* 1954ii, 944-948.
- ROSEBURY, T. 1938. The problem of dental caries. In *Dental Science and Dental Art* (Edited by S. M. GORDON). Lea & Febiger, Philadelphia.
- RUSHTON, M. 1933. On the fine contour lines of the enamel of milk teeth. *Dent. Rec.* **53**, 170-171.
- SARNAT, B. G. and SCHOUR, I. 1941. Enamel hypoplasia (Chronologic enamel aplasia) in relation to systemic disease. *J. Amer. dent. Ass.* **28**, 1989-2000; **29**, 67-75.
- SCHOUR, I. 1936. The neonatal line in the enamel and dentin of the human deciduous teeth and first permanent molar. *J. Amer. dent. Ass.* **23**, 1946-1955.
- SCHOUR, I. 1937. The growth pattern, growth rhythm and ring analysis of the tooth. *Anat. Rec.* (Suppl.) **67**, 45-46.
- SCHOUR, I., CHANDLER, S. B. and TWEEDY, W. R. 1937. Changes in the teeth following parathyroidectomy. *Amer. J. Path.* **13**, 945.
- SCHOUR, I. and MASSLER, M. 1940. Studies in tooth development: the growth pattern of human teeth—I and II. *J. Amer. dent. Ass.* **27**, 1778-1793; **27**, 1918-1931.
- SCHOUR, I. and SMITH, M. C. 1934. The histologic changes in the enamel and dentin of the rat incisors in acute and chronic experimental fluorosis. *Univ. Ariz. Coll. Agric. Tech. Bull.* **52**, 69.
- SCHOUR, I. and SMITH, M. C. 1935. Mottled teeth: An experimental and histologic analysis. *J. Amer. dent. Ass.* **22**, 796-813.
- SHELDON, M., BIBBY, B. G. and BALES, M. S. 1945. The relationship between microscopic enamel defects and infantile debilities. *J. dent. Res.* **24**, 109-116.
- STAZ, J. 1943. Hypoplastic teeth and dental caries. *S. Afr. Med. J.* **17**, 1.
- STONES, H. H. 1948. *Oral and Dental Diseases* (2nd Ed.). Livingstone, Edinburgh.

- SWANSON, J. H. 1931. Age-incidence of lines of Retzius in enamel of human permanent teeth. *J. Amer. dent. Ass.* **18**, 819-826.
- THOMA, K. H. 1950. *Oral Pathology* (3rd Ed.). Mosby, St. Louis.
- TOVERUD, K. U. and TOVERUD, G. 1931. Studies on the mineral metabolism during pregnancy and lactation and its bearing on the disposition to rickets and dental caries. *Acta paediat., Stockh.* **12**, 67-106.
- WALKHOFF, O. 1895. Ueber das Wesen und die Entstehung von Entwicklungsfehlern in der Struktur menschlicher Zähne und ihre Bedeutung für das spätere Leben. *Dtsch. Mschr. Zahnheilk.* **13**, 305-319.
- WESTIN, G. 1935. *Die Fluorose der Kiefer und Zähne*. Svenska Tandl.-Sällskapets Festskrift. Fahicrantz, Stockholm.
- WESTIN, G. 1937. The histopathology of the teeth with special reference to hypovitaminotic changes. In *An Investigation into Questions of Social Hygiene in the Counties of Västerbotten and Norrbotten, Sweden*, pp. 156-229. Hakan Ohlsson, Lund.
- WOLBACH, S. B. and HOWE, P. R. 1933. The incisor teeth of albino rats and guinea pigs in vitamin A deficiency and repair. *Amer. J. Path.* **9**, 275.

ELECTRON MICROSCOPY OF FORMING ENAMEL

R. W. FEARNHEAD

The London Hospital Medical College

Abstract—A cell membrane separating the cytoplasm of the ameloblast from newly formed enamel was demonstrated in ultra-thin sections obtained from tooth germs of young rats. Study of the submicroscopic organization of the formative zone of the enamel indicates that a granular "precursor substance" synthesized by the ameloblasts is secreted into the extra-cellular environment where fibrillogenesis and mineralization is taking place.

Résumé—Le développement de l'émail de rongeurs a été étudié pour établir si l'adamantogenèse est un processus intra ou extra-cellulaire. Des incisives et des molaires en voie de développement de rats, âgés de 5 et 10 jours, ont été incluses dans de l'araldite ou du méthacrylate, après fixation à l'acide osmique. Des coupes fines ont été réalisées, sans décalcification, à différents niveaux de la couronne de ces dents pour obtenir ainsi une idée de l'organisation sub-microscopique de l'émail en voie de formation au cours de quatre différents stades de la vie de l'améloblaste. Les stades choisis comprennent:

1. Le stade initial de l'adamantogenèse
2. Le début de la fibrogenèse
3. Le stade de l'adamantogenèse active
4. Le stade final de l'adamantogenèse

Dans les pièces incluses dans l'Araldite, une membrane cellulaire, entourant l'extrémité formatrice de l'améloblaste, a pu être mise en évidence dans ces différents stades. La membrane cellulaire sépare dans chaque cas les inclusions cytoplasmiques de la cellule des granules et fibres extra-cellulaires. Les résultats obtenus semblent indiquer qu'une "substance précurseur" granulaire est synthétisée par les améloblastes. Ce matériel précurseur est éliminé dans la région extra-cellulaire où se produisent la fibrogenèse et la minéralisation.

Zusammenfassung—Die Bildung des Schmelzes von Nagetieren wurde untersucht, um herauszufinden, ob die Amelogenese ein intrazellulärer oder ein extrazellulärer Vorgang ist. In der Entwicklung befindliche Incisivi und Molaren von 5-10 Tage alten Ratten wurden nach Osmium-Fixation in Araldit oder Methacrylat eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden ohne vorherige Entkalkung von verschiedenen Kronenabschnitten der sich entwickelnden Zähne angefertigt, um einen Einblick in die submikroskopischen Strukturen der Schmelzbildungsbereiche während vier verschiedener Stadien des Lebenszyklus der Ameloblasten zu gewinnen. Die vier untersuchten Stadien waren:

1. Das Initialstadium der Amelogenese,
2. Der Beginn der Fibrillenbildung,
3. Die Amelogenese in vollem Gange,
4. Das Endstadium der Amelogenese.

In dem in Araldit eingebetteten Material konnte in allen untersuchten Stadien eine Zellmembran gefunden werden, die das formative Ende der Ameloblasten umgibt. Die Zellmembran trennte in allen Fällen die Organellen des Zytoplasmas von den extrazellulären Granula und Fibrillen. Diese Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass durch die Ameloblasten eine körnige "Vorläufersubstanz" synthetisiert wird. Diese körnige Substanz ergießt sich dann in die extrazelluläre Region, wo die Fibrillogenese und die Mineralisation stattfinden.

SEVERAL AUTHORITIES have expressed the opinion that amelogenesis in rodents is entirely an intra-cellular process. From a functional viewpoint this concept places the ameloblasts in the same category as epithelial cells of the hair follicle which elaborate hair keratin intra-cellularly (BIRBECK and MERCER, 1957). This at first sight appears appropriate, for ontogenetically, phylogenetically and chemically, hairs and teeth are closely related structures. The view that enamel formation is an intra-cellular process is favoured by WATSON and AVERY (1954), QUIGLEY (1959), LENZ (1959) and FRANK and SOGNAES (1960), who reached this conclusion because of the absence of a cell membrane between the cytoplasm of the formative end of the ameloblast, and the newly formed enamel matrix in their preparations. The present study provides evidence which demonstrates the existence of a cell membrane in this situation.

MATERIALS AND METHODS

Ultra-thin sections were cut with either glass or diamond knives on a microtome which makes use of the thermal advance and magneto-constriction principle described by HAANSTRA (1954). The sections supported by a formvar film on copper electron microscope grids were examined using a Siemens Elmiskop I electron microscope. Blocks containing the specimen were trimmed so as to contain at the apex of a pyramid the formative region of the ameloblast and its immediate environment. Some specimens were trimmed so that the apex of the pyramid was positioned near the cervical part of the tooth germ, some near the crown, and in others mid-way between crown and cervix. In this way the relationship between the formative end of the ameloblast, and the forming front of the enamel could be selected for study at three points in the life cycle of the ameloblasts; namely, the initial stages of amelogenesis, a stage when the ameloblast might be expected to be fully active, and the final stages of amelogenesis. The material was obtained from developing incisors and molars of 5-10 day old rats. These were embedded in either araldite or methacrylate after fixation in DALTON's (1953) fixative or buffered (pH 7.2) 1% osmium tetroxide solution at room temperature.

RESULTS

In the araldite embedded sections a cell membrane was clearly demonstrated between the formative end of the ameloblast and the newly formed enamel matrix in each of the three stages studied (Figs. 1-4). Methacrylate embedding, however, produced a considerable separation of the formative end of the ameloblast cytoplasm from the forming enamel which precluded reliable interpretation of the relationship between cell and newly formed enamel.

Initial stage of amelogenesis

Dentinogenesis commences a short time before amelogenesis, the first increments of enamel are thus deposited on a thin layer (approximately 20-30 μ) of mineralized dentine. At the commencement of dentinogenesis the pre-ameloblast cells are separated from the newly differentiated odontoblasts by a narrow region which has low electron density and which contains faintly banded fibres of the collagen type.

This region widens as dentinogenesis commences and the mineralization of the dentine, which is heralded by an abrupt increase in electron density, begins at the surface which forms the junction with the pre-ameloblast cells. Amelogenesis also commences from this surface after a small amount of dentine has mineralized. Electron micrographs from regions where dentine mineralization has commenced but the enamel matrix has not yet formed, show that the first evidence of activity by the ameloblasts is an increase in the distance between the cell membrane of the ameloblast at its formative end and the newly mineralized dentine surface (FEARNHEAD, 1960a). This widening extra-cellular region becomes packed with small 50–70 Å granules around the formative ends of the ameloblasts (Fig. 1). Moreover, in this region the cell membrane shows signs of becoming folded and invaginated in a most complex fashion so that, at the formative end, finger-like processes of cytoplasm dip down towards the dentine in the extra-cellular environment. In some regions the invaginated parts of the cell membrane are more electron dense than the remainder of the cell membrane. These parts of the cell membrane are invariably associated with extra-cellular regions rich in granules. The extra-cellular granules are separated from each other by a substance which does not scatter electrons readily and which presumably represents the position of a fluid phase. Electron-dense fibres form apparently spontaneously, in this extra-cellular environment commencing at the surface of the mineralized dentine (Fig. 2). The newly formed fibres which are more electron-dense than the extra-cellular granules radiate from the outer surface of the dentine, their long axis being approximately perpendicular to this surface. There is some evidence of a periodicity of about 50–70 Å on the fibres and in many places they appear to be grouped into strands consisting of several fibres, connected by "cross-linking" granules. There is a striking similarity in density between the electron dense fibres of the enamel matrix and the electron dense structures at the calcification front of dentine. This similarity prompted FEARNHEAD (1960b) to make a more detailed examination of this point and this work provided evidence that the increased electron density is due to the initial deposition of mineral nuclei.

Fully active amelogenesis

The relationship between the various components of forming enamel, and the formative end of the ameloblast, is maintained throughout the formative activity, the newly formed matrix being separated from the cytoplasm and the cell membrane by masses of extra cellular granules (Fig. 3).

Completion of amelogenesis

On completion of the enamel the ameloblasts undergo marked cytological changes, they lose their high columnar form, the nucleus becomes crenated and clumps of nuclear material form irregular masses in the nucleus. The cytoplasm also becomes filled with various types of inclusions, and the cell membrane is not folded in quite such a complex manner as that of the fully differentiated ameloblast. Nevertheless the cell membrane continues to separate the cytoplasm of the cell from the formed enamel surface. The region in which the primary enamel cuticle is destined to form consists, at this stage, of a narrow zone having few extra-cellular granules (Fig. 4).

Mineralization

The site of mineralization of the enamel matrix is marked by a striking contrast between granules (diameter 50–70 Å) which have poor electron scattering capacity, and fibres (75–100 Å diam. \times 0.1–1.0 μ) which have a much greater electron scattering property (FEARNHEAD, 1960b). In the depths of the enamel where mineralization is more advanced, both granules and fibres are replaced by "tape-like" crystals which give a diffraction pattern characteristic of apatite.

Diffraction patterns and the electronmicrographs of newly formed enamel support the view that the appearance of fibres coincides with the deposition of very small apatite crystallites from which further growth takes place with the eventual formation of the tape-like crystals which can be obtained from the deeper layers of developing enamel.

DISCUSSION

Evidence that the ameloblasts are actively engaged in synthesis and secretion is provided by the character of the organelles and their organization within the cytoplasm. Most of the mitochondria are situated between the nucleus and the non-formative end of the cell. The mid-portion of the cell between the nucleus and the formative end is packed with an array of granular membranes which constitute the endoplasmic reticulum. The whole cytoplasm is rich in "Palade granules" and concentrated at the formative end are numerous vesicles and cysterni, some of which appear to be discharging their contents into the extra-cellular region.

Most of the authors who conclude that enamel matrix is formed intra-cellularly used methacrylate embedding media. In the preliminary phase of the present study both methacrylate and epoxy resin (araldite) was used, and it was noticed that in the methacrylate embedded specimens considerable disruption occurred especially where the fibres were in contact with less stable cellular elements. The disruptive effect on cells by methacrylate polymerization has also been recorded by BIRBECK and MERCER (1958). The fact that a cell membrane can be demonstrated at the formative end of the ameloblasts in araldite embedded specimens indicates that its absence in the methacrylate embedded specimens is due to the embedding procedure.

In all the electron micrographs prepared for the present study after araldite embedding, a cell membrane was present between the cell, and the granules and fibres. The evidence provided in this paper therefore favours the view that a granular "precursor substance" is synthesized within the cell, and this is then discharged into the extra-cellular region where the granules undergo fibrillogenesis and mineralization.

Note added in proof: WATSON, M. L. (1960) *J. biophys. biochem. Cytol.* 7, 489–492, now supports the concept of extra-cellular enamel formation, his electron micrographs leave no doubt about the existence of a cell membrane between newly formed enamel and the cytoplasm of the ameloblast. Unfortunately WATSON's results were not available to the author when this manuscript was being prepared and so could not be given proper consideration in the text.

REFERENCES

- BIRBECK, M. S. C. and MERCER, E. H. 1957. The electron microscopy of the human hair follicle. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 203-214, 215-222, 223-230.
- BIRBECK, M. S. C. and MERCER, E. H. 1958. Applications of an epoxide embedding medium to electron microscopy. *J.R. micr. Soc.* **76**, 159-161.
- FEARNHEAD, R. W. 1960a. *Electron Microscopy in Anatomy*, pp. 241-260. Edward Arnold, London.
- FEARNHEAD, R. W. 1960b. Mineralisation of rat enamel. *Nature, Lond.* **188**, 509-510.
- FRANK, R. M. and SOGNAES, R. F. 1960. Electron microscopy of matrix formation and calcification in rat enamel. *Arch. oral Biol.* **1**, 339-348.
- HAANSTRA, H. B. 1955. A simple ultramicrotome. *Phillips Tech. Rev.* **17**, 178-183.
- LENZ, H. 1958. Electron microscopical study of enamel development. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **13**, 991-1005.
- QUIGLEY, M. B. 1959. Electron microscopy of developing enamel matrix in the Syrian hamster. *J. dent. Res.* **38**, 180-187.
- WATSON, M. L. and AVERY, J. K. 1954. The development of the hamster lower incisor as observed by electron microscopy. *Amer. J. Anat.* **95**, 109-162.

All the electron micrographs are from sections of rat molar tooth germs fixed in Dalton's fixative (DALTON, A. J. (1953) *Int. Rev. Cytol.* **2**, 403) and embedded in araldite.

ABBREVIATIONS

- C = Cell membrane.
E.G. = Extra-cellular granules.
E. = Enamel.
E.D. = Electron dense fibres.

ELECTRON MICROSCOPY OF FORMING ENAMEL

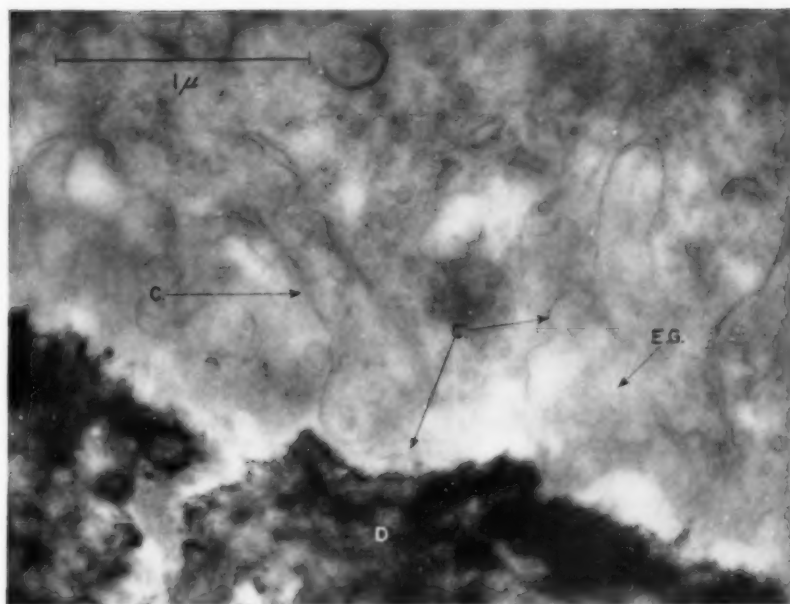


FIG. 1. First sign of amelogenesis. The secretion of granules into the extra-cellular region between the outer surface of mineralized dentine and the formative end of the ameloblast.

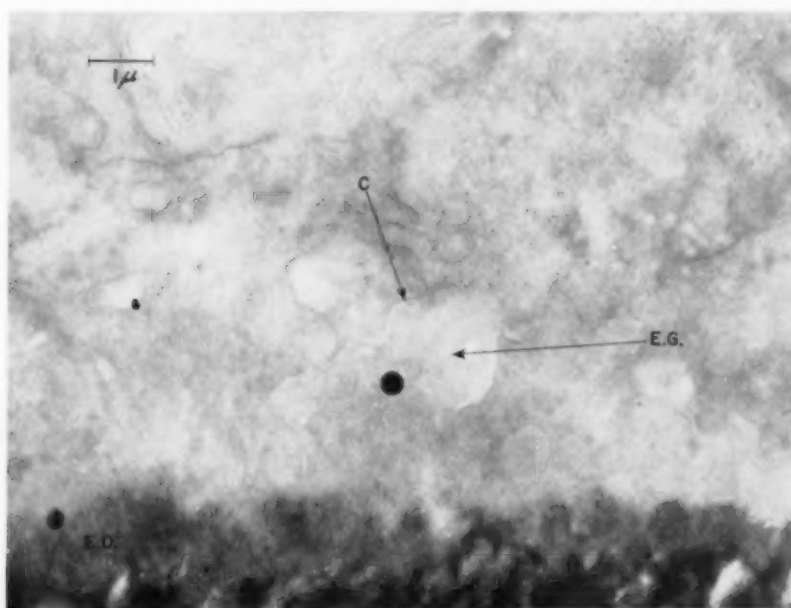


FIG. 2. Second stage, the formation of electron dense fibres which begins on the surface of the dentine, the fibres projecting outwards from this surface into the extra-cellular granules.

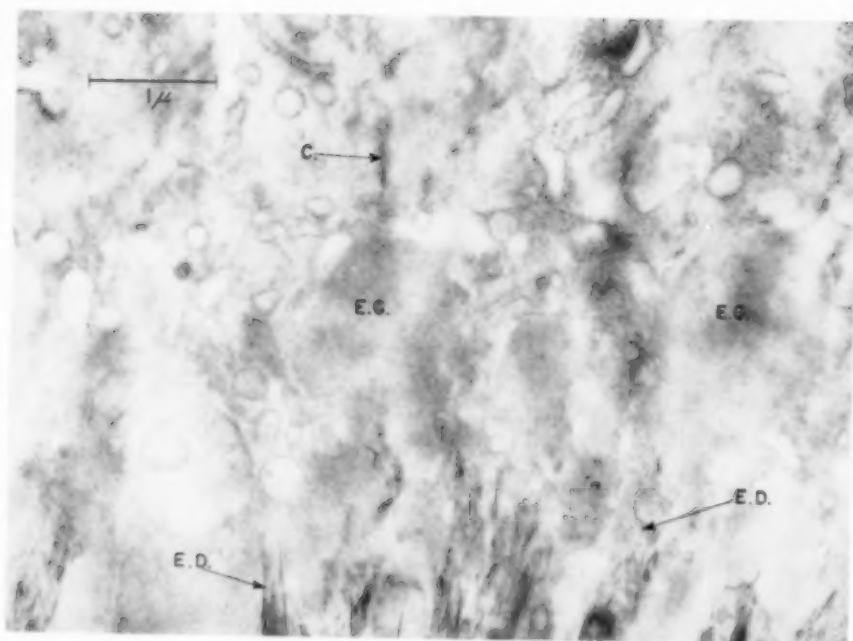


FIG. 3. Fully active amelogenesis. Junction between the formative end of the ameloblast and extra-cellular granules. Notice the electron-dense fibres are forming among the extra-cellular granules.

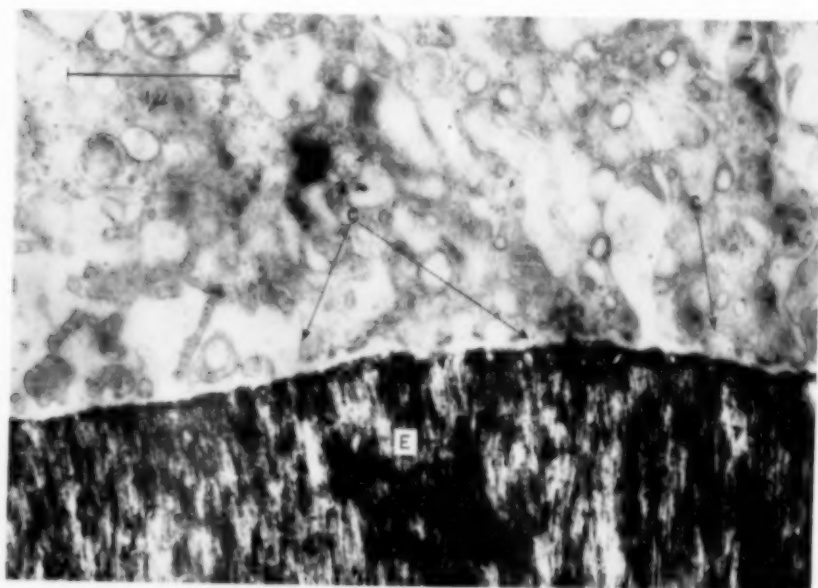


FIG. 4. The final stage of amelogenesis. The cells of the reduced enamel epithelium have an intact cell membrane which is separated from the enamel surface by a narrow region containing a few extra-cellular granules.

CONCEPTIONS NOUVELLES CONCERNANT L'EMAIL ET SA GENESE

R. M. FRANK

Institut Dentaire, Faculté de Médecine, Strasbourg, France

Résumé—L'étude de l'adamantogenèse chez le rat, à l'aide de coupes fines non décalcifiées, examinées au microscope électronique, montre que la cristallisation inorganique débute au niveau des protéines fibreuses longitudinales de la matrice organique. La croissance du cristal d'apatite se continue le long de l'axe de ces fibrilles. Puis des cristaux d'apatite jeunes apparaissent après fusion partielle, puis totale de fibrilles calcifiées adjacentes.

Dans l'émail adulte humain ou de rat, des variations dans la cristallisation inorganique ont été observées: se traduisant d'une part par l'existence de cristaux d'apatite bien individualisés, formés par fusion complète de fibrilles calcifiées adjacentes et d'autre part par la présence de zones d'aspect réticulaire, liées à la croissance incomplète des cristaux d'apatite. Dans ce cas, les fibrilles calcifiées adjacentes n'ont pas fusionné ou n'ont fusionné que partiellement.

L'existence d'une croissance épitactique entre deux phases cristallines (protéine fibreuse et cristal d'apatite) semble vraisemblable pour l'émail.

Abstract—The study of rat amelogenesis was performed, under the electron microscope, on non-decalcified ultra-thin sections. It appeared that inorganic crystallization starts on the longitudinal fibrous proteins of enamel organic matrix. The apatite crystal growth follows the organic fibre axis. Young apatite crystals appear after partial and then total fusion of adjacent calcified fibrils.

In both adult human and rat enamel, variations in the inorganic crystallization have been observed. These are related partly to the presence of well-differentiated apatite crystals, formed by complete fusion of adjacent calcified fibrils, and partly to reticular zones, resulting from the incomplete apatite crystal growth. In this latter case, the adjacent calcified fibrils are unfused or are only partly fused.

An epitactic growth between the two enamel crystalline phases (the fibrous protein and apatite crystals) seems likely.

Zusammenfassung—Die Untersuchung der Amelogenese bei Ratten mit Hilfe von nicht entkalkten Dünnschnitten, die mit dem Elektronenmikroskop betrachtet wurden, zeigt, dass die Kristallisation anorganischen Materials an den longitudinalen Proteinfibrillen der organischen Matrix beginnt. Das Wachstum der Apatitkristalle setzt sich entlang der Achse dieser Fibrillen fort. Junge Apatitkristalle erscheinen nach teilweiser Vereinigung der benachbarten verkalkten Fibrillen und führen zu deren vollständiger Vereinigung.

Im reifen Schmelz des Menschen oder der Ratte sind Variationen bei der anorganischen Kristallisation beobachtet worden. Diese sind darauf zurückzuführen, dass sich einerseits gut ausdifferenzierte Apatitkristalle bilden, die durch die vollständige Vereinigung benachbarter verkalkter Fibrillen entstehen und dass andererseits Zonen mit retikulärem Charakter auf Grund des unvollständigen Wachstums der Apatitkristalle erscheinen. In diesem Falle haben sich die benachbarten verkalkten Fibrillen nicht oder nur teilweise vereinigt.

Ein "epitaktisches" Wachstum zwischen den beiden Kristallisationsphasen (Proteinfibrillen und Apatitkristalle) ist anzunehmen.

LE PROBLÈME de la croissance des cristaux d'apatite et les rapports existant entre les phases organique et minérale sont d'une importance capitale pour tous les tissus calcifiés et en particulier pour l'émail humain. Ce tissu hautement calcifié présente des cristaux d'hydroxyapatite ainsi qu'une matrice organique d'origine épithéliale comprenant des protéines fibreuses et une substance fondamentale riche en mucoprotéines.

Il est admis classiquement que les cristaux d'apatite remplissent les mailles formées par les protéines fibreuses de sorte que, dans l'émail adulte, ces éléments organique et inorganique seraient placés côte à côte.

Grâce à des perfectionnements techniques liés à la mise au point de couteaux de diamant (FERNANDEZ-MORAN, 1953), il est devenu possible d'effectuer des coupes ultra-fines d'émail aux différents stades de développement y compris celui du produit adulte totalement calcifié (FRANK, 1959; FEARNHEAD, 1960). Les rapports entre protéines fibreuses et cristaux d'apatite ont, par suite, pu être précisés au microscope électronique.

C'est ainsi que l'étude de l'émail humain adulte a révélé une hétérogénéité structurale extrême au point de vue de la cristallisation inorganique (FRANK, 1959; FRANK, SOGNAES and KERN, 1960). Dans un même prisme d'émail, nous avons observé des différences fondamentales, se traduisant d'une part, par la présence de cristaux d'apatite à contours extrêmement nets (Fig. 1) et d'autre part, par des régions sub-microscopiques à aspect réticulaire et à contours cristallins imprécis (Fig. 2).

Par suite de cette diversité de structures difficile à expliquer, il est devenu indispensable de suivre le développement de la matrice organique et des cristaux d'apatite au cours de l'adamantogenèse et de comparer les résultats obtenus avec ceux réalisés sur l'émail adulte.

I. TECHNIQUE

La croissance des cristaux d'apatite est étudiée chez le rat, alors que l'observation des rapports entre les protéines fibreuses et les éléments inorganiques est menée sur l'émail adulte humain et l'émail de rats âgés d'un an selon une technique décrite en détail précédemment (FRANK *et al.*, 1960). Après fixation à l'acide osmique à 1% et inclusion dans un mélange de méthacrylates de méthyle et de n butyle, les pièces sont coupées à l'aide d'un microtome Servall-Porter équipé d'un couteau de diamant.

Différents microscopes électroniques ont servi à l'étude des coupes fines notamment un Elmiskop Siemens I, un RCA type EMU-3 b et un microscope O.P.L.

II. RÉSULTATS

(a) *Croissance des cristaux d'apatite au cours de l'adamantogenèse*

Au cours de l'adamantogenèse chez le rat, c'est la matrice organique de l'émail qui est tout d'abord élaborée. Les protéines fibreuses constituent une sorte de réticulum à trois dimensions, présentant des fibrilles longitudinales approximativement parallèles les unes aux autres, avec de courtes fibrilles transversales joignant les

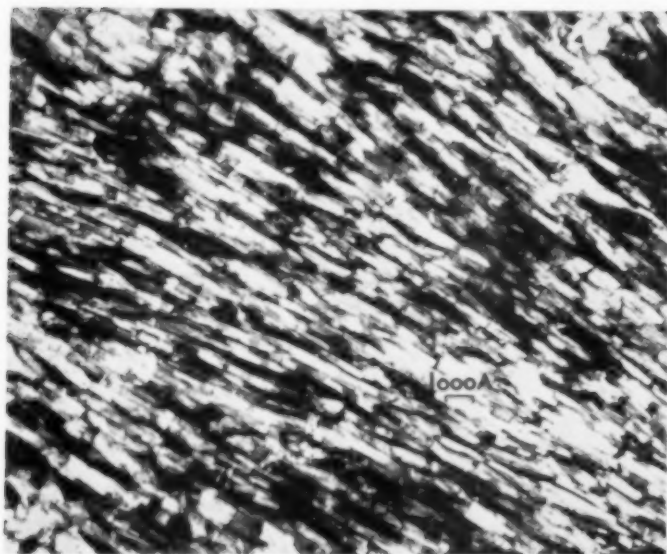


FIG. 1. Coupe fine non décalcifiée d'émail humain adulte montrant un agrégat de cristaux d'apatite bien développés à contours extrêmement nets (grossissement = 40.000 diamètres; tirage photographique négatif).

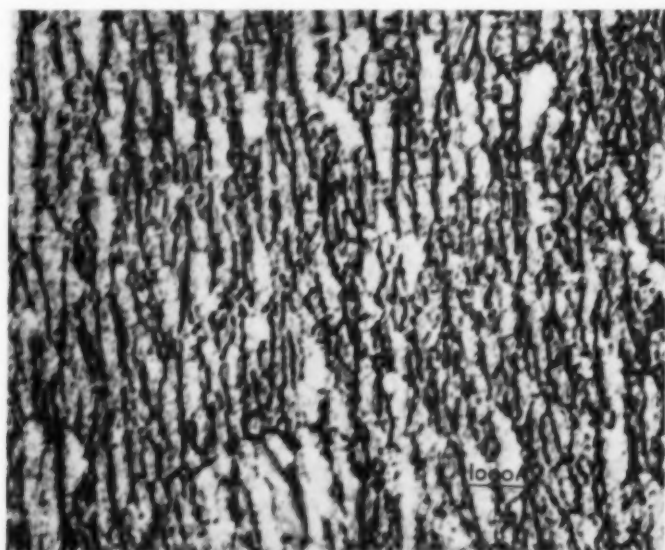


FIG. 2. Coupe fine non décalcifiée d'émail humain adulte. Aspect réticulaire des fibrilles calcifiées à contours cristallins imprécis. Alternance de fibrilles calcifiées, non fusionnées, et de fibrilles calcifiées, partiellement fusionnées. (Grossissement = 85.000 diamètres; tirage photographique négatif).

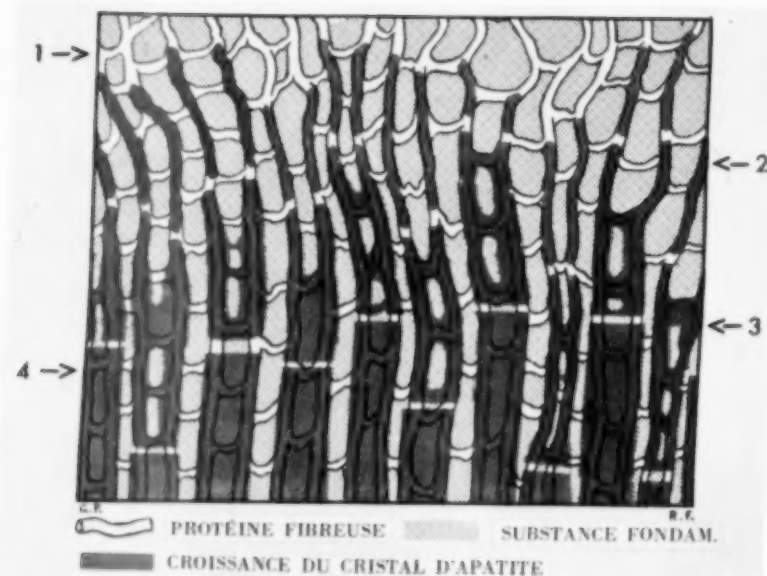


FIG. 3

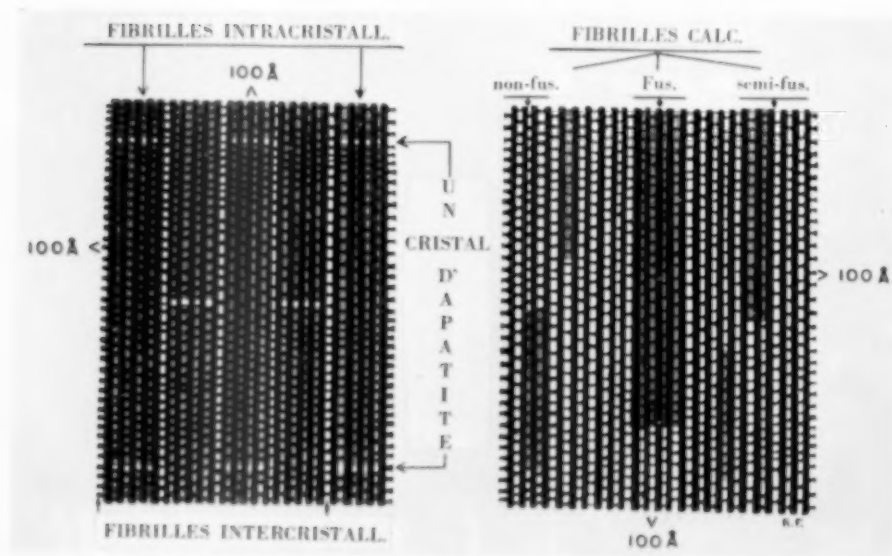


FIG. 4

fibrilles longitudinales voisines (Fig. 3, stade 1). Les mailles plus ou moins arrondies de ce réticulum sont remplies par un matériel granuleux qui obscurcit les détails fibrillaires et correspond vraisemblablement à la substance fondamentale (Fig. 3, stade 1).

La croissance des cristaux d'apatite débute peu de temps après la différenciation de la matrice organique. Elle commence électivement au niveau des protéines fibreuses longitudinales du réticulum sous forme de noyaux punctiformes de cristallisation. Par suite de la croissance de ces centres initiaux de cristallisation inorganique, de minces bandes calcifiées apparaissent exactement superposées aux protéines fibreuses longitudinales (Fig. 3, stade 2).

Ce processus de calcification se caractérise par une dissémination de noyaux de cristallisation inorganique le long des fibrilles longitudinales du réticulum. Ces dernières ne se calcifient pas toutes en même temps et la croissance des cristaux inorganiques est plus avancée sur certaines fibrilles que sur d'autres. Un front de calcification n'est pas visible.

La croissance des cristaux d'apatite se poursuit en épaisseur débordant ainsi les limites des protéines fibreuses longitudinales. Celles-ci fusionnent d'abord partiellement (Fig. 3, stade 3) puis totalement (Fig. 3, stade 4) avec les bandes calcifiées adjacentes. Le cristal d'apatite adulte apparaît ainsi peu à peu. Les protéines fibreuses emprisonnées dans la masse du cristal d'apatite sont elles-mêmes imprégnées de matériel inorganique. Tout se passe comme s'il y avait eu intercroissance entre un cristal organique constitué par les protéines fibreuses et un cristal inorganique, constitué par l'hydroxyapatite, phénomène bien connu en minéralogie et décrit par ROYER (1928) sous le nom d'épitaxie.

La croissance des cristaux d'apatite n'aboutit pas toujours à la fusion totale de bandes calcifiées adjacentes. Ces dernières ne se fusionnent souvent pas ou du moins fusionnent que partiellement c'est ainsi que des aspects plus ou moins réticulaires, (Fig. 3, stades 2 et 3), peuvent être retrouvés dans l'émail adulte. La diffraction électronique appliquée à ces zones donnent des diagrammes de Debye-Scherrer typiques des apatites. Cet aspect réticulaire semble correspondre à une région de moins bonne minéralisation.

FIG. 3. Représentation schématique de la croissance du cristal d'apatite dans l'émail de rat.

- (1) Formation de la matrice organique.
- (2) Apparition de bandes calcifiées le long des protéines fibreuses longitudinales.
- (3) Fusion partielle de fibrilles calcifiées adjacentes.
- (4) Cristal d'apatite jeune.

FIG. 4. Représentation schématique des rapports entre protéine fibreuse et cristal d'apatite dans l'émail humain. A gauche, zone de cristaux d'apatite bien différenciés, formés par la fusion complète de fibrilles calcifiées adjacentes. A droite, variation dans la minéralisation de l'émail, présentant des fibrilles calcifiées non fusionnées (aspect réticulaire), semi-fusionnées et totalement fusionnées.

(b) *Rapport existant entre les protéines fibreuses et les cristaux d'apatite dans l'émail adulte*

L'étude de l'adamantogenèse nous a permis de comprendre les variations structurales de la cristallisation inorganique au niveau du tissu adulte.

Dans l'émail humain, on peut rencontrer des cristaux d'apatite bien développés, à contours cristallins nets (Fig. 1). Ces derniers apparaissent en coupe longitudinale sous forme de petites baguettes rectangulaires allongées (Fig. 1), alors qu'en coupe transversale ils présentent une forme hexagonale. Les cristaux d'apatite bien développés sont constitués par une fusion complète de bandes calcifiées adjacentes (Fig. 4, schéma de gauche). Les protéines fibreuses, imprégnées de matériel inorganique, sont emprisonnées dans la masse du cristal d'apatite.

A côté de ces plages de bonne cristallisation inorganique (Fig. 1), on trouve souvent, dans un même prisme d'émail, des régions où le fusionnement des bandes calcifiées adjacentes s'est fait de façon imparfaite et irrégulière. C'est ainsi que des fibrilles calcifiées, non fusionnées, alternent avec des fibrilles calcifiées semi-fusionnées ou totalement fusionnées (comparer Fig. 2, avec schéma de droite de la Fig. 4). Dans ces zones, les contours cristallins sont peu nets et on observe surtout un aspect réticulaire, dû aux protéines fibreuses non fusionnées ou semi-fusionnées, imprégnées de matériel minéral.

La diffraction électronique, appliquée à ces régions d'aspect réticulaire, donne des diagrammes caractéristiques du groupe des apatites.

III. DISCUSSION

Il apparaît que l'émail est constitué par l'intercroissance d'une protéine fibreuse et de cristaux d'apatite qui, loin d'être placés côte à côte, sont intimement liés. Il semble que le cristal organique, représenté par la protéine fibreuse, est capable d'induire l'aggrégation d'un noyau d'ions phosphate et calcium. Une fois que ce noyau d'hydroxyapatite est formé, la supersaturation locale des liquides tissulaires est suffisante pour susciter une croissance spontanée d'un cristal d'apatite adulte. Ce concept épitactique a surtout été appliqué au tissu osseux pour expliquer le mécanisme de la calcification et semble avoir détrôné la théorie classique de la précipitation de Robison (WEIDMANN, 1960). Les rapports intimes ainsi que l'orientation ultrastructurale similaire entre la matrice fibrillaire et les constituants inorganiques de l'émail laissent penser que la théorie épitactique semble également valable pour l'émail. Mais des investigations plus poussées sont nécessaires pour clarifier un certain nombre de données: notamment la nature et la structure cristalline des protéines fibreuses de l'émail.

En effet cette protéine fibreuse a été classée comme une eukératine, mais celle-ci, contrairement aux autres kératines, présente un contenu en cystine extrêmement bas (STACK, 1955). D'autre part, elle contiendrait une certaine quantité d'hydroxyproline (STACK, 1955). C'est pour ces raisons que GELLER (1958), au cours d'une mise au point sur la nature biochimique des protéines fibreuses de l'émail, pense que celle-ci se rapproche plus du groupe des collagènes que de celui des kératines. Sous le microscope électronique, les fibrilles de l'émail se rapprochent certainement plus

des kératines tant par la dimension de leur diamètre que par l'absence de striations périodiques transversales. Ces observations viennent confirmer les résultats histo-chimiques réalisés sur la matrice d'émail jeune et montrant la présence de groupement sulfhydryle.

L'hétérogénéité de la cristallisation inorganique de l'émail adulte, constatée sous le microscope électronique, explique pourquoi des divergences considérables ont été notées dans la taille des cristaux d'apatite, calculée à partir de diagrammes de diffraction par rayons X, ou mesurée directement sur des clichés de microscopie électronique. Dans une zone de cristaux d'apatite bien développés (Fig. 1), la taille moyenne des cristaux sera plus élevée que dans des zones de cristaux d'apatite, constitués par des fibrilles calcifiées non fusionnées (Fig. 2). Enfin les différences de biréfringence de l'émail observées sous le microscope à lumière polarisante, trouvent leur explication dans la croissance plus ou moins poussée des cristaux d'apatite, donnant des zones plus ou moins bien minéralisées.

RÉFÉRENCES

- FEARNHEAD, R. W. 1960. Preparations of ultra-thin sections of mineralized human enamel. *Nature, Lond.* **185**, 550-551.
- FERNANDEZ-MORAN, H. 1953. A diamond knife for ultra-thin sectioning. *Exp. Cell Res.* **5**, 255-256.
- FRANK, R. M. 1959. Etude au microscope électronique de l'émail humain: rapports existant entre le réseau fibrillaire et les cristaux d'apatite. *Actualités Odontostomat.* **13**, 13-35.
- FRANK, R. M., SOGNAES, R. F. and KERN, R. 1960. Calcification of dental tissues with special reference to enamel ultrastructure. In *Calcification in Biological Systems*, pp. 163-202. American Association for the Advancement of Science, Washington.
- GELLER, J. H. 1958. Metabolic significance of collagen in tooth structure. *J. dent. Res.* **37**, 276-279.
- ROYER, L. 1928. Sur l'accolement régulier des cristaux d'espèces différentes. *Bull. Soc. franç. Miner.* **51**, 7.
- STACK, M. V. 1955. The chemical nature of the organic matrix of bone, dentin and enamel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **60**, 585-595.
- WEIDMANN, S. M. 1960. Review of modern concepts on calcification. *Arch. oral Biol.* **1**, 259-264.

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DER MINERALISATION DES ZAHNSCHMELZES UND DER BEGINNENDEN SCHMELZKARIES

H. LENZ

Technische Universität Berlin, Lehrgebiet Biologie und Anthropologie, und
Kariesforschungsinstitut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
Aussenstelle Berlin-Dahlem

Zusammenfassung—Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Mineralisation des Schmelzes konnte nachgewiesen werden, dass die Hydroxylapatitkristalle orientiert in die organische Matrix eingelagert werden. Die Matrix bestimmt daher das Muster des Schmelzes. Im histologischen Präparat lässt sich die unverkalkte Matrix originalgetreu darstellen. Bedingt durch Veränderungen während der Mineralisation, geben dagegen Schnitte aus entkalktem Material die organische Substanz nur unvollständig wieder. Rückschlüsse in bezug auf die Struktur des Schmelzes aus entkalkten Schnitten können daher leicht zu Fehldeutungen führen. Jedoch lassen sich mit dem Grad der Erhaltung der organischen Matrix Aussagen über den Mineralisationszustand des Schmelzes machen.

An den Schmelzkristallen konnte beobachtet werden, dass sie erst bei stärkeren Einwirkungen (fortgeschrittene Karies, stärkere Anätzung) angegriffen werden, im Initialstadium der Karies jedoch unverändert erscheinen. Diese Feststellungen deuten in Verbindung mit röntgenographischen, chemischen und klinischen Befunden an, dass ausser der organischen Matrix die im Schmelz neben dem Hydroxylapatit vorhandenen karbonathaltigen Anteile bei der Karies eine Rolle spielen können.

Abstract—The precisely oriented deposition of hydroxyl-apatite crystals in enamel is evidence that the pattern of mineralization is determined by the enamel matrix. Because of this, electronmicroscope studies of undecalcified matrix can yield valuable information about enamel structure.

This investigation was carried out on sections of tooth germs in which the organic fibrils of the enamel matrix were retained in their original position and arrangement. In decalcified material, on the other hand, the net-like appearance of the organic material is not a true representation of the organic matrix. A false idea of the structure of enamel can thus be easily obtained. Changes in the organic matrix take place during the process of mineralization so that only part of the organic matrix can be found in decalcified sections. These remains, however, give important information on the state of mineralization of the enamel.

In this connexion it must be pointed out that future chemical investigations of the organic framework must include not only material obtained through calcification but also undecalcified enamel in its original state.

It was established from investigations of enamel caries that hydroxyl-apatite crystals are attacked only when the attaching agencies are strong. In the early stages the contours of the crystals appear unchanged. This evidence, along with radiographic, chemical and clinical findings, suggests that the carbonate-containing part in the organic matrix next to the hydroxyl-apatite may play a special role in caries.

Résumé—La constatation du dépôt orienté des cristaux d'apatites dans la matrice organique de l'émail permet d'affirmer que le modèle de l'émail minéralisé est conditionné par la matrice. C'est pour cela que la mise en évidence au microscope électronique de la matrice non calcifiée est un progrès important pour la compréhension de la structure de l'émail.

Nos investigations montrent, sur des coupes de bourgeons dentaires, les fibrilles organiques de l'émail dans leur orientation originelle. Par contre les structures en réseau de la substance organique, obtenue après décalcification, ne sont pas à considérer comme des images réelles de la matrice organique. Des conclusions concernant la structure de l'émail peuvent par suite aboutir facilement à des erreurs. Pendant la minéralisation il se produit des changements dans la matrice organique qui sont responsables du fait que la substance organique ne peut être conservée que partiellement en préparation décalcifiée. Ces restes donnent pourtant de précieuses indications sur le degré de minéralisation de l'émail.

Dans cet ordre d'idée, il apparaît qu'au cours des investigations chimiques de la trame organique de l'émail, il faut tenir compte non seulement du matériel obtenu après décalcification mais aussi de l'émail non encore minéralisé.

Les recherches sur la carie dentaire de l'émail ont montré que les cristaux d'apatite ne sont attaqués qu'à un stade avancé. Dans les stades initiaux de la carie, ces cristaux présentent par contre des contours intacts. Ce qui semble démontrer, en conjonction avec des recherches radiographiques, chimiques et cliniques, que la matrice organique et la fraction "carbonate" existant dans l'émail à côté de l'hydroxyapatite peuvent également jouer un rôle dans la carie.

EINEN der wichtigsten Schritte zur Klärung der Schmelzstrukturen bedeutet nach der Sichtbarmachung der Schmelzkristalle zweifellos die elektronenmikroskopische Darstellung der ersten Anlage des Schmelzes und der organischen Matrix. Gerade diese an der Grenze des lichteoptischen Auflösungsvermögens gelegenen Teile waren es, die bisher zu den verschiedensten Ansichten über die Schmelzstrukturen Anlass gegeben haben. Nachdem in den ersten Jahren der Elektronenmikroskopie die Deutung von Abdruckpräparaten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen geführt hatte, scheint sich durch die Darstellung der ersten Schmelzanlage und der unverkalkten organischen Matrix ein Weg anzubahnen, einheitlichere Ergebnisse zu erzielen.

So konnte von SCOTT und NYLEN (1960), FEARNEHEAD (1960), WATSON und AVERY (1954), sowie von uns gezeigt werden, dass das organische Gerüst des Schmelzes von den Ameloblasten in Form von sublichtmikroskopischen Fibrillen gebildet wird, die in einer bestimmten Art und Weise orientiert sind (Abb. 1).

Diese organische Matrix entsteht unmittelbar im Protoplasma der Ameloblasten im Gegensatz zu den kollagenen Fibrillen der Dentinegrundsubstanz, die von den Odontoblasten ausserhalb der Zellen gebildet werden (Abb. 2 und 3).

Damit werden die vor allem im letzten Jahrzehnt in den Vordergrund getretenen Auffassungen widerlegt, nach denen Schmelz und Dentin eine gemeinsame organische, aus dem Bindegewebe stammende Matrix haben (FISCHER, 1933; FORSHUFVUD, 1950). Die Fibrillen beider Gewebe unterscheiden sich nicht nur in ihrer Genese, sondern auch in ihrer Struktur und Orientierung ganz klar voneinander (Abb. 4).

Der Vergleich von Schnitten der unverkalkten organischen Matrix aus dem Bildungsstadium des Schmelzes mit Abdrücken vom mineralisierten Schmelz liess bereits vermuten, dass die Apatitkristalle orientiert eingelagert werden, eine Ansicht, die bereits von Chemikern, Mineralogen und Polarisationsmikroskopikern vertreten wurde (Abb. 5). Den sichtbaren Beweis zu diesen auf indirektem Wege gefundenen Ergebnissen lieferten uns Schnitte vom Schmelz im Stadium der Mineralisation (Abb. 6). Sie zeigen, dass die Kristalle mit ihrer c-Achse längs der Fibrillen eingelagert werden, also eine echte Epitaxie vorliegt. Daraus ergibt sich auch, dass die

Struktur des Schmelzes von der organischen Matrix vorbestimmt, d.h. bereits während der Entwicklung festgelegt wird.

Die Kristalle sind im Anfang der Mineralisation noch nicht fest miteinander verbunden. Dies steht in Übereinstimmung mit den polarisationsoptischen Befunden von SCHMIDT und KEIL (1958), sowie GUSTAFSON (1945) und GUSTAFSON (1959), die mizellare Spalten im unreifen Schmelz beschrieben. Im weiteren Verlauf der Reifung kommt es zu einer Ausfüllung der Lücken, so dass der reife Schmelz ein festes kompaktes Gebilde wird, aus dem sich bei Anwendung der Abdruckmethode im Gegensatz zum unreifen Schmelz kaum noch Kristalle aus dem Gefüge herausreißen lassen. Nach unseren Beobachtungen beginnt die Mineralisation an der Schmelz-Dentin-Grenze und schreitet allmählich zur Schmelzoberfläche vor.

Die orientierte Einlagerung der Kristalle und die Übereinstimmung der Muster vom mineralisierten Schmelz und dem organischen Gerüst liefert meiner Ansicht nach auch den Nachweis, dass die auf Abbildungen von Schnitten aus dem Entwicklungsstadium des Schmelzes dargestellten Fibrillen in ihrer ursprünglichen Struktur und Orientierung wiedergegeben werden. Die netzartigen Strukturen der organischen Substanz aus entkalktem Material sind daher nicht als wahres Abbild der organischen Matrix zu betrachten (Abb. 7). Schlussfolgerungen in bezug auf die Struktur des Schmelzes aus diesen Präparaten können daher leicht zu Fehldeutungen führen. Jedoch lassen sich aus dem Zustand der erhaltengebliebenen organischen Substanz andere wertvolle Schlüsse ziehen.

Bei der Entkalkung des normalen reifen Schmelzes geht ein grosser Teil der Matrix verloren, und es lassen sich nur Reste der ursprünglich fibrillären Substanz darstellen, die ausserdem noch stark desorientiert sind. STACK fand bei seinen chemischen Untersuchungen, dass ein Teil der organischen Matrix bei der Entkalkung des Schmelzes löslich wird, wobei pH-Konzentration und Art des Entkalkungsmittels eine gewisse Rolle spielen. Dass diese Veränderungen aber nicht nur durch die Auslösung der anorganischen Bestandteile bedingt sein können, bewiesen uns unsere Untersuchungen über die Mineralisation des Schmelzes. Wir entkalkten Schmelz, dessen Mineralisation gerade erst an der Schmelz-Dentin-Grenze eingesetzt hatte, so dass die übrige Matrix noch unverkalkt war. Dabei zeigte es sich, dass sich trotz der gleichen Behandlung die unverkalkten und verkalkten Partien der Matrix unterschiedlich verhielten. Während im bereits mineralisierten Bezirk nur Teile der organischen Matrix erhaltenblieben, liessen sie sich im unverkalkten Gebiet in ihrer ursprünglichen Form darstellen (Abb. 8).

Es muss also bereits während der Einlagerung der Kristalle eine Veränderung der organischen Teile eingetreten sein. Je mehr der Schmelz mineralisiert, um so schwieriger wird es, die organische Matrix darzustellen. In der Literatur wird aus diesem Grunde auch von einer Abnahme der organischen Substanz gesprochen. Es handelt sich aber anscheinend nicht um einen echten Verlust, sondern in erster Linie um eine chemische Veränderung durch die Mineralisation, bei der ursprünglich unlösliche Anteile der organischen Matrix je nach dem Grad der Verkalkung in einen mehr oder weniger löslichen Zustand übergehen. Die im histologischen Präparat sichtbaren Teile der entkalkten organischen Matrix geben somit Aufschluss über den



Abb. 1. Organische Matrix des Schmelzes aus einem Zahnkeim. Schnitt OsO_4 -fixiert. $\times 7200$.

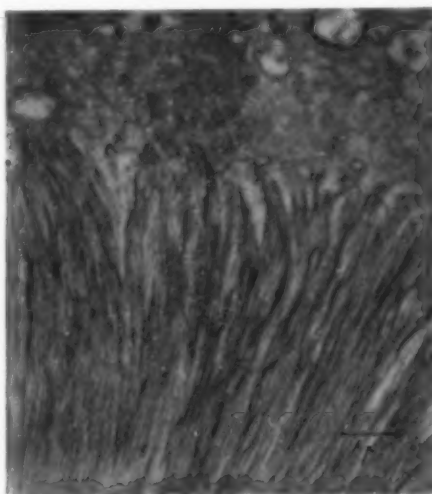


Abb. 2. Bildung der organischen Matrix des Schmelzes im Protoplasma der Ameloblasten. Schnitt OsO_4 -fixiert. $\times 15.000$.

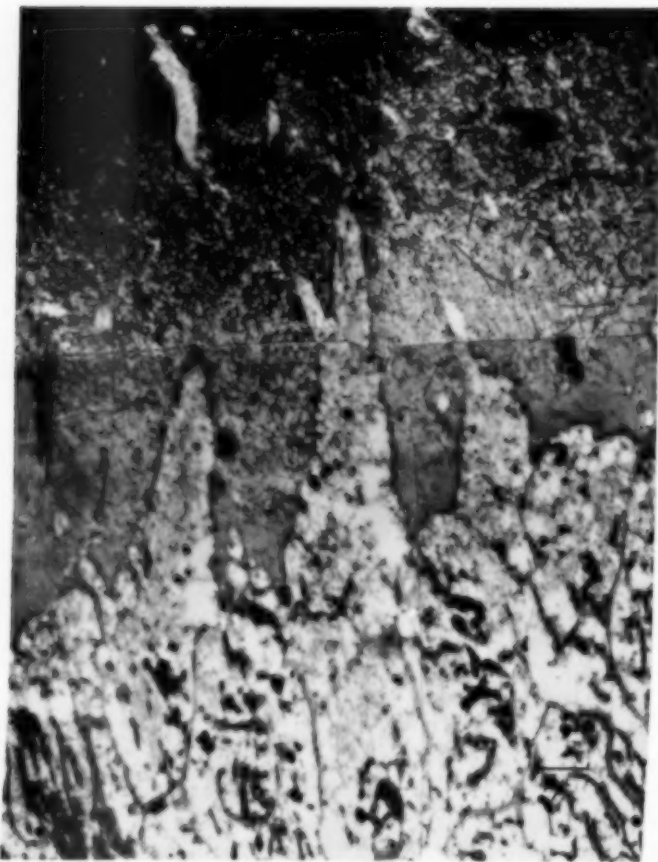


ABB. 3. Bildung der kollagenen Fibrillen der Dentinmatrix durch die Odontoblasten. Schnitt OsO_4 -fixiert. $\times 7200$.

UNTERSUCHUNGEN DER MINERALISATION DES ZAHNSCHMELZES

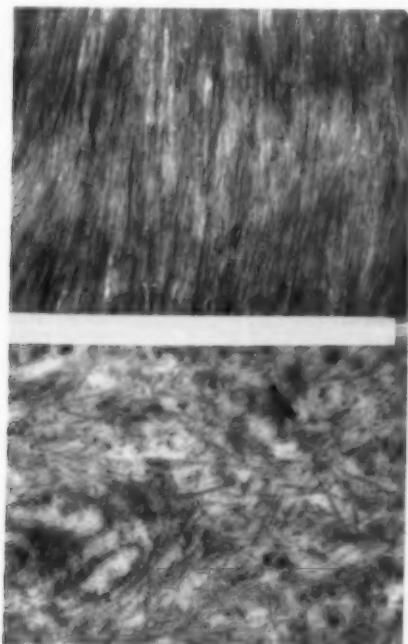


Abb. 4. Organische Matrix von Schmelz (oben) und Dentin (unten). $\times 18\,000$.

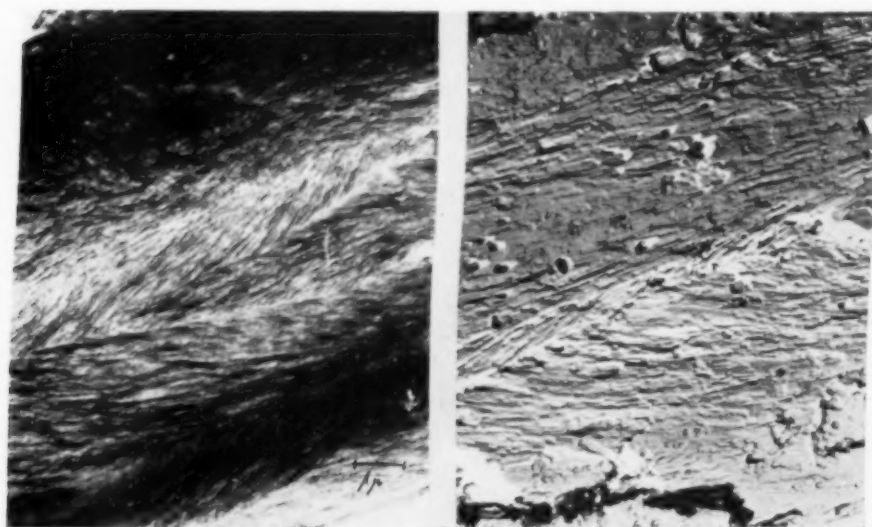


Abb. 5. Vergleich eines Schnittes von der unverkalkten organischen Matrix (links) mit einem Abdruck vom mineralisierten Schmelz (rechts). Matrix und Kristalle haben die gleiche Orientierung. $\times 7200$.

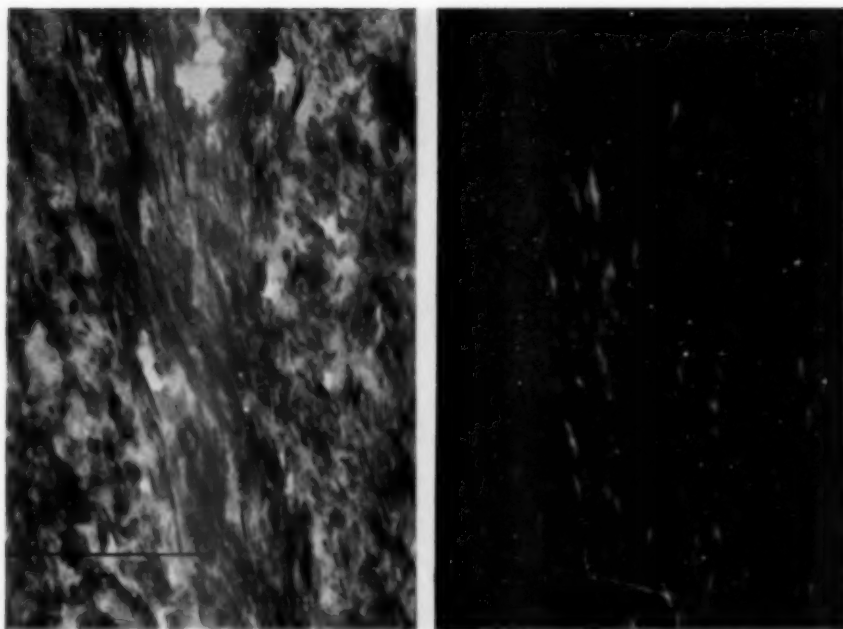


Abb. 6. Hell- und Dunkelfeld eines Schnittes vom Schmelz im Stadium der Mineralisation. Im Dunkelfeld leuchten die längs der Fibrillen orientierten Kristalle auf. $\times 30.000$.

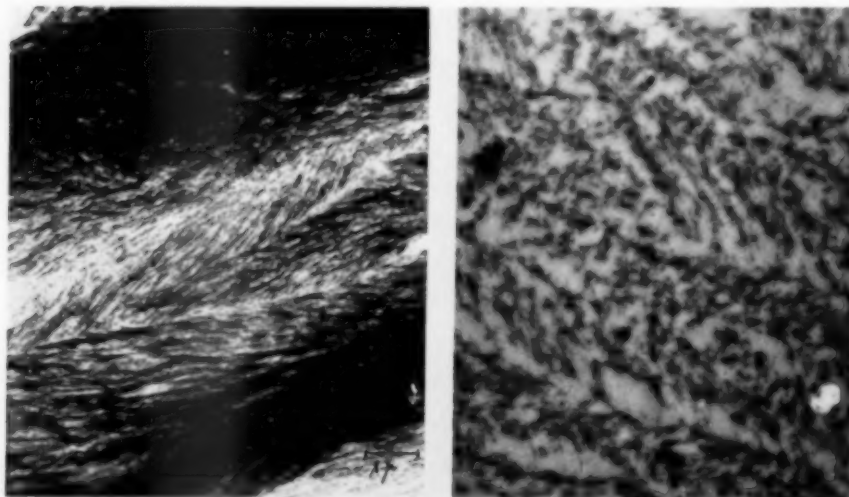


Abb. 7. Organische Matrix unverkalkt (links) und entkalkt (rechts). Im entkalkten Präparat ist ein Teil der organischen Matrix verlorengegangen. $\times 7200$.

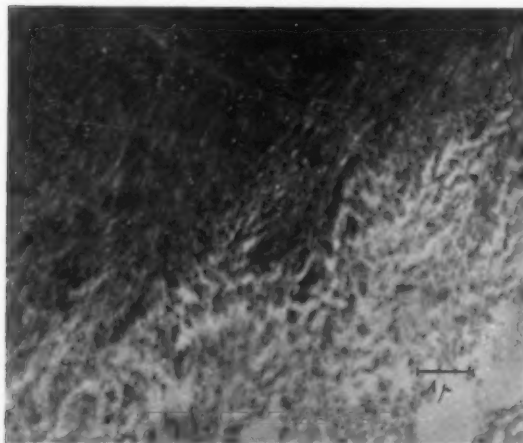


Abb. 8. Teilweise mineralisierter Schmelz nach der Entkalkung mit Titriplex III. Während im oberen, noch unverkalkten Bereich die organische Matrix fast vollständig erhaltengeblieben ist, ist sie im bereits mineralisierten Präparat (unten) nach der Entkalkung z.T. verlorengegangen. $\times 7200$.

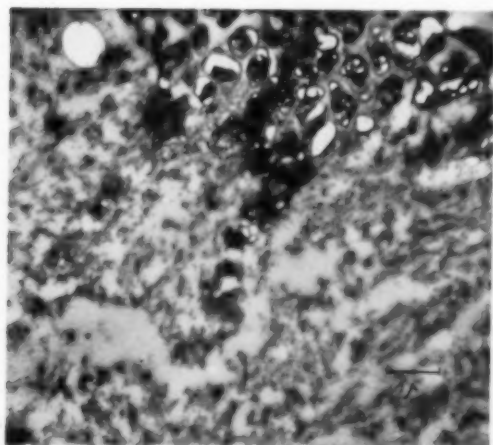


Abb. 9. Kariöser Schmelz, mit Titriplex III entkalkt. Schnitt. Im Bereich des Kariesbeginns neben Bakterien (oben) verhältnismässig viel organische Matrix. $\times 7200$.



Abb. 10. Aus dem Bereich einer beginnenden Schmelzkaries isolierte Schmelzkristalle. $\times 30.000$.

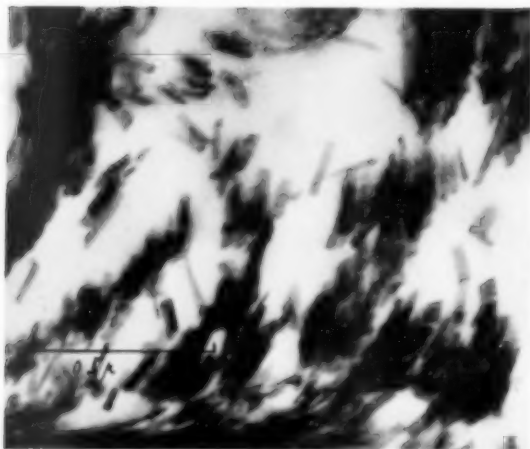


Abb. 11. Schnitt durch nicht voll mineralisierten Schmelz. $\times 52,000$.

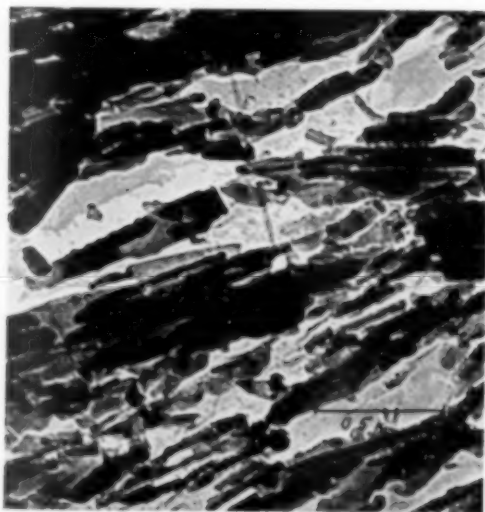


Abb. 12. Schmelzkristalle. Abdruck vom angeätzten Schmelz mit anhaftenden Kristallen. Im Vergleich zu den Abbildungen 10 und 11 erscheinen die Kristalle angegriffen und zeigen nicht mehr die klaren Konturen. $\times 36,000$.

Mineralisationszustand des Schmelzes, lassen aber, wie anfangs schon erwähnt, wegen ihrer Unvollständigkeit und Desorientierung keine sicheren Schlüsse auf die Struktur des Schmelzes zu. Hierzu eignen sich besser Präparate von der unverkalkten Matrix.

Zu bemerken ist noch, dass das Ausmass der erhaltengebliebenen organischen Substanz bei den verschiedenen Entkalkungsmitteln zwar unterschiedlich ist, sich aber immer dieselben Abstufungen im Verhältnis zum Mineralisationszustand ergaben.

Es lässt sich so u.a. nachweisen, dass in Bezirken des Schmelzes, die sich durch Veränderung der Doppelbrechung auszeichnen und aus denen sich bei Anwendung der Abdruckmethode im Gegensatz zum normalen Schmelz viele Kristalle aus dem Gefüge herausreissen lassen, die organische Matrix in einem weit grösseren Masse als im umgebenden normalen Schmelz erhaltenbleibt, d.h. es handelt sich bei diesen Zonen um unvollständig mineralisierte Teile des Schmelzes.

Diese Bezirke scheinen auch eher von der Karies befallen zu werden. Wir konnten beobachten, dass sich im Bereich des Kariesbeginns auffällig viel organische Matrix im entkalkten Präparat vorfand (Abb. 9). Da im schlecht mineralisierten Schmelz das Kristallgefüge noch aufgelockert ist, sind Bahnen vorhanden, die das Eindringen der schmelzerstörenden Stoffe in die Tiefe ermöglichen. Welche Rolle dabei die organische Matrix spielt und welche chemischen Veränderungen bei der Mineralisation sowie bei der Karies eintreten, ist noch unbekannt. Aufschlüsse darüber werden sich wohl erst ergeben, wenn es gelungen ist, die chemische Zusammensetzung des organischen Schmelzgerüsts aufzuklären. Die elektronenmikroskopisch gewonnenen histologischen Ergebnisse weisen aber darauf hin, dass bei künftigen chemischen Untersuchungen der organischen Substanzen des Schmelzes neben den aus entkalktem Material gewonnenen Anteilen auch den ursprünglichen, unverkalkten Beachtung geschenkt werden muss.

Betrachtet man einmal nur die anorganische Komponente des fertig mineralisierten Schmelzes, so haben sich, wie bereits gezeigt, während der Reifung die anfangs vorhandenen Lücken zwischen den Kristallen geschlossen, so dass im reifen Schmelz die Kristalle fest miteinander verbunden sind. Bei der beginnenden Schmelzkaries tritt nun eine Auflockerung dieses festen Verbandes ein, und es lassen sich wieder einzelne Kristalle isolieren. Lichtoptisch und polarisationsoptisch manifestiert sich dies in der Imbibierbarkeit und Veränderung der Doppelbrechung. Darüberhinaus lassen sich aber durch die elektronenmikroskopische Sichtbarmachung der einzelnen Kristalle zusätzlich Aussagen über Zustand und Struktur dieser Kristalle machen und daraus in Verbindung mit chemischen und mineralogischen Untersuchungen wertvolle Schlüsse ziehen. Die aus dem Gebiet der beginnenden Schmelzkaries isolierten Kristalle unterscheiden sich nicht von denen, die sich aus dem noch nicht vollständig mineralisierten Schmelz darstellen lassen, d.h., es scheint durch den ersten kariösen Angriff ein unreifes Stadium wieder eingetreten zu sein (Abb. 10, 11). Vergleicht man dagegen die aus stärker angeätztem Schmelz oder einer fortgeschrittenen Phase der Karies gewonnenen Kristalle mit denen aus dem Initialstadium der Karies, so findet man, dass diese angegriffen erscheinen und nicht mehr ihre ursprüngliche Form haben (Abb. 12). Daraus lässt sich schliessen, dass bei dem ersten Angriff auf den Schmelz—wie z.B. bei beginnender Karies—der ja wesentlich

milder ist als eine Anätzung, zuerst Teile herausgelöst werden, die zwischen den Kristallen liegen, und erst, nachdem dadurch Bahnen geschaffen sind, der eigentliche Angriff auf die Kristalle erfolgt.

Röntgenstrukturuntersuchungen ergaben als einzige kristalline Komponente des Schmelzes stets Apatitstrukturen (TRAUTZ, 1959). Aus chemischen Untersuchungen ist aber bekannt, dass neben anderen Spurenbestandteilen auch Carbonat im Schmelz vorhanden ist, das aber nach den bisherigen Ergebnissen nicht in kristalliner Form vorliegt. TRAUTZ hält es nach seinen Experimenten für möglich, dass ein mehr oder weniger amorphes Material neben dem Apatit vorhanden ist und daher nicht im Röntgendiagramm erscheint. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass die im Reifungsstadium vorhandenen mizellaren Spalten zwischen den Apatitkristallen durch amorphes, vor allem carbonathaltiges Material, geschlossen werden. Erfolgt ein Angriff auf den Schmelz wie z.B. bei beginnender Karies, so wird zuerst das leichter lösliche Carbonat ausgelöst, und es werden somit Bahnen für den Angriff auf den schwerer löslichen Apatit geschaffen.

Auf die Haltbarkeit dieser Ansicht scheint auch die unterschiedliche Resistenz der Zähne in den verschiedenen Lebensalterstufen hinzudeuten. Durch Austauschreaktionen mit im Speichel enthaltenen Ionen erfolgt eine Reduzierung des Carbonatgehaltes, so dass das weniger resistente Material im Laufe der Zeit durch stabileres ersetzt wird. Die Untersuchungen von LITTLE und BRUDEVOLD (1958) scheinen auch darauf hinzudeuten; denn sie stellten im Schmelz mit zunehmendem Alter eine Abnahme des Carbonatgehaltes fest. Weitere Aufschlüsse zu diesem Problem hoffen wir, aus noch im Gang befindlichen chemischen Versuchen zu bekommen.

Sollten diese Versuche unsere Vermutungen bestätigen, so deutet sich hier eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der kariesprophylaktischen Wirkung des Fluors neben der des Einbaus des Fluorions in das Apatitgitter an, und es könnten sich neue Aussichten einer Kariesprophylaxe am bereits in Funktion befindlichen Zahn eröffnen.

LITERATUR

- FEARNHEAD, R. W. 1960. Comparative observations on the ultra-structure of the inorganic and organic components of dental enamel. Verhdl. IV. Internat. Kongr. Elekt. Mikr., Band II, 353-357. Springer, Berlin.
- FISCHER, G. 1933. Zur Biologie des Schmelzgewebes menschlicher Zähne. *Dtsch. zahnärztl. Wschr.* **36**, 351-355.
- FORSHEFVUD, S. 1950. Contribution to the microscopic appearance of ultracapillaries—Reticular fibres. *Acta odont. scand.* **8**, 345-353.
- GUSTAFSON, A.-G. 1959. A morphologic investigation of certain variations in the structure and mineralization of human dental enamel. *Odont. Tidskr.* **67**, 361-472.
- GUSTAFSON, G. 1945. The structure of human dental enamel. *Odont. Tidskr.* **53**, 48-64.
- LENZ, H. 1958a. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Schmelzgenese. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **13**, 991-1005.
- LENZ, H. 1958b. Electron microscopic studies on the organic matrix of enamel and dentin. *Yale J. Biol. Med.* **31**, 164-167.
- LITTLE, M. F. und BRUDEVOLD, F. 1958. A study of the inorganic carbon dioxide in intact human enamel. *J. dent. Res.* **37**, 991.
- SCHMIDT, W. J. und KIEL, A. 1958. *Die gesunden und die erkrankten Zahngewebe des Menschen und der Wirbeltiere im Polarisationsmikroskop.* München.

- SCOTT, D. B. und NYLEN, M. U. 1960. Changing concepts in dental histology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **85**, 133-144.
- STARK, M. 1957. Mineral and protein levels in enamel from human, monkey, and rat molars. Verhandl. 4. Tagung ORCA Malmö 1957; *Odont. Revy* 89-93.
- TRAUTZ, O. R. 1959. Certain aspects of submicroscopic structure of enamel, and X-ray diffraction studies of tooth structure. Vortr. Symp. Oral Biol. I.A.D.R., New York.
- WATSON, M. L. und AVERY, J. K. 1954. The development of the hamster lower incisor as observed by electron microscopy. *Amer. J. Anat.* **95**, 109-162.

ol.
4
961

CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG UND PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN DES SCHMELZOBERHÄUTCHENS

H. SCHÜLE

Aus dem Zahnärztlichen Institut
und der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Kiel

Zusammenfassung—Das Schmelzoberhäutchen wirkt möglicherweise als Membran zwischen der Mundflüssigkeit und dem Schmelz und beeinflusst dadurch u. U. den Ablauf der biochemischen Prozesse, die zur Karies führen.

Es wurden deshalb Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften des Schmelzoberhäutchens von nicht durchgebrochenen Zähnen (PSOH), frisch durchgebrochenen Zähnen (SSOH) und vom exogenen Schmelzoberhäutchen auf Zähnen höherer Altersklassen (TSOH) durchgeführt.

Das Protein des PSOH, SSOH und TSOH ist gegen Säuren, Alkalien und proteolytische Enzyme weitgehend resistent. Obwohl die Resistenz im Gegensatz zu typischen Keratinen (Haar, Horn) auch nach Vorbehandlung mit Reduktionsmitteln gefunden wird, ist es nach den Ergebnissen der chemischen Untersuchungen möglich, dass das Protein des PSOH und SSOH zu den Keratinen gehört. Der positive Beweis kann aber erst von den bereits im Gang befindlichen Röntgenstrukturanalysen erwartet werden. Das TSOH hat eine abweichende AS-Zusammensetzung. Histochemisch wurden im PSOH, SSOH und TSOH Mucopolysaccharide nachgewiesen.

Das SOH ist für Milchsäure, Salzsäure, Kochsalz, Glycin, Asparaginsäure, Glucose, Methylenblau sowie Calcium- und Phosphat-Ionen permeabel, während Cystin, Kongorot und Trypanblau zurückgehalten werden. Die Permeabilität nimmt vom PSOH über das SSOH zum TSOH ab.

Da entmineralisierende Stoffe durch das SOH zum Schmelz und die aufgelösten Schmelzminerale durch das SOH zur Mundhöhle diffundieren können, ist es unwahrscheinlich, dass das SOH eine Schutzfunktion für die Schmelzprismen erfüllt.

Abstract—Structural analysis of proteins from the primary enamel cuticle, the secondary enamel cuticle and the tertiary enamel cuticle (exogen enamel cuticle) showed that the AS-complex of the enamel protein corresponded to the primary and secondary enamel cuticle which differed from the tertiary enamel cuticle. The protein of the enamel cuticle is resistant to acids, alkalis and proteolytic enzymes, unlike typical keratins (hair, horn) even after prior treatment with reducing agents. A PAS-positive material which was an acid mucopolysaccharide was also found. On the basis of these experimental results the common procedure of classifying enamel and enamel cuticle proteins as keratins is not valid. From chemical analysis it is possible that they belong to the keratin group. Whether or not they definitely are keratins will only be established by micro-structural analysis. The tertiary enamel cuticle has a different AS-composition.

The enamel cuticle is permeable to lactic acid, hydrochloric acid, sodium chloride, glycine, aspartic acid, glucose, methylene blue and calcium and phosphate ions; on the other hand, cystine, congo red and trypan blue are held back. The permeability decreases from the primary enamel cuticle to the secondary enamel cuticle and then to the tertiary enamel cuticle.

Since the demineralizing materials can diffuse through the enamel cuticle to the enamel, and dissolved minerals can also diffuse from the enamel to the mouth, it is

unlikely that the enamel cuticle has any power to protect the enamel prisms from cariogenic poisons.

Résumé—L'analyse des protéines des cuticules primaire, secondaire et tertiaire a montré que la composition en acides aminés des protéines de l'émail et de la cuticule primaire et secondaire sont identiques. Par contre, celle de la cuticule tertiaire est différente. La protéine cuticulaire résiste aux acides, alcalis et ferments protéolytiques. Contrairement aux kératines typiques (cheveux, corne), cette résistance est conservée après traitement par des agents réducteurs. Une substance PAS positive a été mise en évidence histochimiquement, dont au moins une partie pourrait appartenir au groupe des mucopolysaccharides acides. Ces résultats indiquent que les arguments contre une classification des protéines de l'émail et de la cuticule comme kératine ne sont pas valables. D'après les analyses chimiques, il est toujours possible qu'il s'agisse de kératine. La réponse définitive ne pourra être apportée que par l'analyse ultra-structurale. La cuticule tertiaire a une composition différente en acides aminés.

La cuticule est perméable à l'acide lactique, à l'acide chlorhydrique, au chlorure de sodium, à la glycine, à l'acide asparagique, au glucose, au calcium, aux ions phosphates et au bleu de méthylène. Par contre la cystine, le rouge congo et le bleu de trypan ne la transpercent pas. Cette perméabilité est décroissante de la cuticule primaire à la cuticule tertiaire.

Bien que les substances décalcifiantes puissent diffuser à travers la cuticule vers l'émail et les minéraux dissouts de l'émail vers la cavité buccale, il est peu probable que la cuticule ait une fonction de protection des prismes de l'émail vis à vis des agents de la carie dentaire.

EINLEITUNG

DAS SCHMELZOVERHÄUTCHEN (SOH) liegt als dünnes, organisches Häutchen zwischen den Schmelzprismen und der Mundflüssigkeit. Der Stoffaustausch zwischen den beiden Medien Schmelz und Mundflüssigkeit hängt also von den Eigenschaften der dazwischenliegenden Membran ab. Die Permeabilität des Schmelzoberhäutchens hat deshalb möglicherweise auch einen Einfluss auf den Ablauf der Prozesse, die zur Schmelzentkalkung und zur Karies führen.

Die Bedeutung des Schmelzoberhäutchens im Rahmen des Kariesgeschehens wurde bisher verschieden beurteilt: teils wurde das intakte SOH als Schutz für die Schmelzprismen gegen kariogene Noxen angesehen, teils wurde dem SOH jegliche Schutzfunktion abgesprochen. Ob das SOH einen Einfluss auf den Ablauf des Kariesprozesses ausübt, hängt von folgenden Faktoren ab:

- (1). Resistenz des SOH gegenüber kariogenen Stoffen
- (2). Permeabilität des SOH für die entmineralisierenden Stoffe
- (3). Permeabilität des SOH für die gelösten Schmelzminerale.

Die Beurteilung der Rolle des SOH im Kariesgeschehen setzt also voraus, dass der stoffliche Aufbau und die Permeabilität des SOH bekannt sind.

(1). DEFINITION DES BEGRIFFES "SCHMELZOVERHÄUTCHEN"

Das SOH wird seit etwa 120 Jahren mit histologischen Methoden intensiv untersucht, ohne dass die Histogenese und Struktur restlos geklärt worden wären. KÖLLIKER (1852), v. EBNER (1902), EULER (1923), MEYER (1925) verstehen unter dem SOH nur die von den Adamantoblasten nach Abschluss der Schmelzbildung gebildete Kutikula. GOTTLIEB (1929), ORBAN (1926) u.a. nehmen an, dass während des Zahndurchbruchs vom Epithel ein zweites organisches Häutchen auf der Schmelzoberfläche

abgelagert wird. In neuerer Zeit haben FRANK (1949), KLEES und KLEES (1958) und SCHÜLE (1959) festgestellt, dass das organische Häutchen auf dem Zahnschmelz höherer Altersklassen nicht mit dem während der Zahnentwicklung gebildeten Häutchen identisch ist. Das auf Zähnen höherer Altersklassen und auf Abrasionsflächen gefundene organische Häutchen ist nach unseren Untersuchungen (SCHÜLE, 1960) posteruptiv und ohne Beteiligung der Pulpa entstanden. Mit histologischen Methoden kann und muss zwischen dem homogenen exogenen SOH und den ubiquitär vorhandenen Bakterienbelägen unterschieden werden (Abb. 1):

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Einteilung gewählt, die diesen Verhältnissen gerecht wird, jedoch in den noch umstrittenen histogenetischen Fragen nichts präjudiziert:

Primäres Schmelzoberhäutchen (PSOH): das von nicht durchgebrochenen Zähnen abgehobene Häutchen

Sekundäres Schmelzoberhäutchen (SSOH): das von frisch durchgebrochenen Zähnen abgehobene Häutchen

Tertiäres Schmelzoberhäutchen (TSOH): das von Zähnen höherer Altersklassen nach Entfernung der Bakterienbeläge abgehobene Häutchen.

Das histogenetische Substrat des PSOH ist die Adamantoblastenkutikula, des SSOH -wenn die Gottlieb'sche Konzeption zutrifft-Adamantoblastenkutikula+Epithelkutikula, während das TSOH genetisch als exogenes Schmelzoberhäutchen bezeichnet werden kann.

(2). LITERATURANGABEN ÜBER DIE CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DES SOH

Bisher sind lediglich folgende Anhaltspunkte über die chemische Zusammensetzung des SOH bekannt:

- (1). Aus der Resistenz des SOH gegen Säuren, Alkalien und proteolytische Fermente wurde geschlossen, dass es aus Keratin bestehe (GOTTLIEB, 1921, 1929; ORBAN und KÖHLER, 1924; u.a.).
- (2). Nach dem Verhalten gegenüber histologischen Färbemethoden wurde geschlossen, dass das SOH nicht aus Keratin bestehe (WESKI, 1922; EULER, 1923; MEYER, 1925).
- (3). Bei orientierenden chemischen Untersuchungen fanden LOSEE und HESS (1949) colorimetrisch 0,94 % Cystin und 1,11 % Methionin. Der niedrige Gehalt an Schwefel, bzw. an schwefelhaltigen Aminosäuren entspricht nicht den üblichen Keratinen.

(3). UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DES SOH

Um das SOH-Protein näher charakterisieren zu können, wurden dessen Bausteine, die Aminosäuren, qualitativ und quantitativ bestimmt, die Resistenz gegen chemische und enzymatische Einflüsse geprüft und untersucht, ob prosthetische Gruppen von Proteiden vorhanden sind.

(a) Aminosäurenbestimmung

Die Tetrazoliumkupplungsreaktion (BARNETT und SELIGMAN, 1954) auf Cystin fiel am PSOH meist negativ (teilweise schwach positiv), am SSOH und TSOH positiv aus (Abb. 2).

Die Ferricyanidreaktion (CHÈVREMENT und FRÉDÉRIC, 1943) war am PSOH, SSOH und TSOH positiv (Abb. 3), ebenso die RSR-Reaktion (BENNET, 1951). Wenn die Bakterienbeläge bei der Präparation nicht entfernt worden waren, fand sich an diesen eine negative oder nur schwach positive Reaktion, so dass diese Reaktion auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Proteins vom SOH und von den Bakterienbelägen hinweist.

Unter Berücksichtigung der histochemischen Spezifitätskontrollen sind damit im SSOH und TSOH Cystin und Cystein nachgewiesen. Die Reaktionen auf Arginin (SAKAGUCHI, 1925) und Tyrosin (SERRA, 1946) waren am PSOH, SSOH und TSOH positiv.

Für die quantitative AS-Analyse wurde eine Methode entwickelt, bei der die Gruppentrennung und die Bestimmung der basischen Aminosäuren mittels Säulenchromatographie an Ionenaustauschern (Dowex 50 W \times 8) vorgenommen werden, während die übrigen AS als DNP-AS im zweidimensionalen Papierchromatogramm bestimmt werden.

Die bei diesen Untersuchungen erhobenen Befunde sind in Abb. 4 dargestellt:

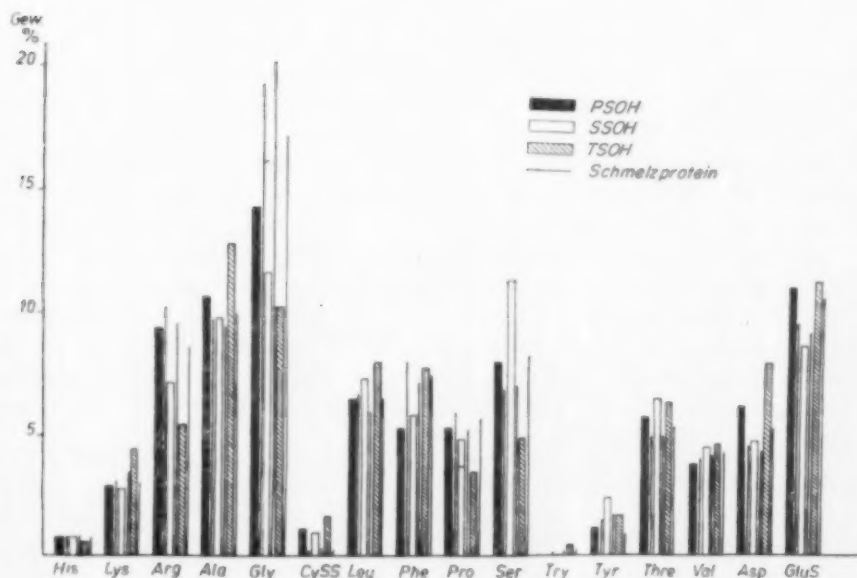


Abb. 4. Ergebnisse der Aminosäurebestimmung.

Aus diesen Befunden lassen sich u.a. folgende Ergebnisse ableiten:

- (1). Die verschiedenen Komponenten des SOH besitzen eine unterschiedliche AS-Zusammensetzung (vgl. z.B. Arginin, Glycin, Serin, Cystin).
- (2). Zwischen dem SSOH und TSOH einerseits, dem zugehörigen Schmelzprotein andererseits bestehen erhebliche Unterschiede in der AS-Zusammensetzung (vgl. z.B. Arginin, Glycin, Cystin).
- (3). Die Zusammensetzung des Schmelzproteins bleibt während des Lebens weitgehend konstant, die Zusammensetzung des SOH ändert sich.
- (4). Typische Keratine enthalten die basischen AS Histidin, Lysin, Arginin im Verhältnis 1:4:12 (BLOCK und VICKERY, 1931). Das Protein des PSOH und des Schmelzes entspricht weitgehend dieser Relation (1:4:11). Beim Protein des SSOH beträgt die Relation 1:4:8,5, beim TSOH 1:7:8,0. Sie unterscheidet sich also vom Keratin.

Die unterschiedliche AS-Zusammensetzung weist darauf hin, dass das SOH verschiedener Entwicklungsstufen aus andersartigen Proteinen besteht.

Wir haben durch morphologische Untersuchungen nachgewiesen (SCHÜLE, 1960), dass während der Funktionsphase des Zahnes eine exogene Oberflächenmembran auf der Schmelzoberfläche gebildet wird. Die chemische Analyse bestätigt und erweitert diesen Befund: das SOH verschiedener Entwicklungsstadien ist nicht nur genetisch verschieden, sondern ist auch aus andersartigen Proteinen aufgebaut.

(b) *Untersuchung auf prosthetische Gruppen*

Die Perjodsäure/Schiffreaktion (HOTCHKISS, 1948; MCMANUS, 1948) war beim PSOH nur in seltenen Fällen, beim SSOH, TSOH und an den Bakterienbelägen stets stark positiv (Abb. 5). Unter Berücksichtigung der Spezifitätskontrollen sind damit Polysaccharide nachgewiesen. SSOH und TSOH besitzen eine Methylblaubindungs-fähigkeit (DEMPSEY *et al.*, 1947) bis pH 3,20 mit Extinction zwischen pH 3,20 und 2,62. Sie zeigen β -Metachromasie. Die Alcianblaureaktion (STEEDMAN, 1950) und die Eisenbindungsreaktion nach HALE (1946) sind positiv. Es ist demnach wahrscheinlich, dass mindestens ein Teil der PAS-positiven Substanzen zu den sauren Mucopolysacchariden gehört.

Saure Mucopolysaccharide spielen bekanntlich bei physiologischen und pathologischen Verkalkungsvorgängen eine grosse Rolle (Knochenbildung, Speichelsteinbildung, Harnsteinbildung). Auf artifiziell gesetzten Schlißflächen wurde ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Bildung des TSOH und der mineralisierten Deckschichten festgestellt (SCHÜLE, 1960). Es erscheint möglich, dass auch ein *kausaler* Zusammenhang besteht, wobei das TSOH die verkalkende Matrix für die mineralisierten Deckschichten bildet.

(c) *Resistenzprüfung des SOH-Proteins*

Das PSOH, SSOH und TSOH ist gegen Säuren (2n HCl), Alkalien (2n NaOH) und proteolytische Fermente (Pepsin, Trypsin, Papain) weitgehend resistent, ebenso wie die typischen Keratine (Vergleichspräparate Haar und Horn).

Typische Keratine werden nach Vorbehandlung mit Reduktionsmitteln durch die oben genannten chemischen und proteolytischen Einwirkungen gelöst. Das PSOH,

SSOH und TSOH bleibt auch nach der Einwirkung von Reduktionsmitteln (KCN, Thioglycolsäure, Na_2S) resistent; lediglich vom SSOH gehen Teile in Lösung.

(4). IST DAS SOH-PROTEIN EIN KERATIN?

Das typische Skleroprotein des Ektoderms ist das Keratin. Der Schmelz stammt vom Ektoderm ab; als Stützprotein wäre deshalb ein Keratin zu erwarten. GOTTLIEB (1921, 1929), ORBAN (1926) u.a. sahen das SOH-Protein wegen der Resistenz gegen Säuren und Alkalien als Keratin an.

Gegen die Einordnung als Keratin wurden folgende Argumente vorgebracht:

- (1). Das SOH enthält nur wenig Cystin (LOSEE und HESS, 1949), während typische Keratine einen hohen Cystingehalt aufweisen
- (2). Das SOH gibt bei der histologischen Untersuchung nicht die typischen Keratinfärbungen (WESKI, 1922; EULER, 1923)
- (3). Das SOH bleibt nach Vorbehandlung mit Reduktionsmitteln gegen Säuren, Alkalien und proteolytische Fermente resistent, während typische Keratine nach dieser Vorbehandlung aufgelöst werden.

Gegen diese Argumente ist festzustellen:

- ad 1: Nach neuerer Ansicht werden auch cystinarme Proteine zu den Keratinen gerechnet, wenn ihre Mikrostruktur, d.h. die Faltung der Polypeptidketten, dem Keratinmuster entspricht (ASTBURY, 1938; krit. Übersicht BLIX *et al.*, 1951).
- ad 2: Der Mechanismus der Keratinfärbung, insbesondere der lange Zeit als spezifisch angesehenen Gram-Ernstfärbung, ist nicht bekannt. Er beruht nach JOHNSON und Mitarb. (1957) nicht auf Reaktionen mit der SH-Gruppe. Da die Gruppe der Keratine Proteine mit sehr unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung umfasst, sind Unterschiede im Verhalten gegenüber Farbstoffen nicht überraschend.
- ad 3: Die Resistenz typischer Keratine gegen die Auflösung durch Säuren, Alkalien und proteolytische Fermente beruht darauf, dass die nebeneinanderliegenden Polypeptidketten durch die Disulfidbrücken des Cystins miteinander verbunden sind. Werden die Disulfidbrücken durch Reduktionsmittel gespalten, geht die Resistenz verloren. Das andersartige Verhalten des SOH-Proteins ist auf den niedrigen Cystingehalt zurückzuführen, sagt also nichts über die Mikrostruktur der Polypeptidketten aus.

Typische Keratine enthalten die basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin im Verhältnis 1:4:12 (BLOCK und VICKERY, 1931). Unsere Bausteinanalyse zeigt, dass das Protein des Schmelzes und des PSOH dieser Relation (weitgehend) entspricht, während das SSOH und TSOH eine andere AS-Zusammensetzung hat.

Aus diesen Betrachtungen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Einwände gegen den Keratincharakter des Proteins vom Schmelz und PSOH nicht stichhaltig sind. Die jahrzehntealte Streitfrage, ob das SOH-Protein ein Keratin ist oder nicht, hoffen wir in Kürze durch die Strukturanalyse mittels Röntgenbeugungsuntersuchungen endgültig klären zu können.

Das SSOH und TSOH besteht nach den Ergebnissen der Bausteinanalyse wahrscheinlich nicht aus Keratin.

(5). DIE PERMEABILITÄT DES SOH

Das Protein des SOH besitzt nach den vorhergegangenen Untersuchungen gegen Säuren, Alkalien und proteolytische Fermente eine hohe, aber nicht vollständige Resistenz. Es ist demnach durchaus möglich, dass das SOH *in vivo* unter dem Einfluss der kariogenen Noxen zunächst intakt bleibt. Die Entmineralisierung des Schmelzes könnte unter diesen Bedingungen nur stattfinden, wenn die entmineralisierenden Agentien durch das SOH zum Schmelz und die gelösten Mineralien zur Mundhöhle diffundieren können. Zur Beurteilung der Funktion des SOH im Kariesgeschehen war es deshalb notwendig, die Permeabilität des SOH für die im Zusammenhang mit der Karies interessierenden Stoffe zu untersuchen.

BERGGREN und MITARBEITER (1946) stellten mit ^{32}P fest, dass die Permeabilität des Schmelzes nach Abschleifen der oberflächlichen Schmelzschichten 100 mal grösser ist als vorher. Dieser Befund zeigt, dass die oberflächlichen Schmelzschichten weniger permeabel sind als die tiefen. Ob die geringere Permeabilität durch das SOH oder durch die höhere Mineralisierung der Schmelzoberfläche hervorgerufen wird, kann nach diesen Untersuchungen nicht entschieden werden.

(6). UNTERSUCHUNG DER PERMEABILITÄT DES SOH

Da das SOH für die Permeabilitätsuntersuchungen erst nach Entkalkung gewonnen werden kann, musste untersucht werden, ob der Entmineralisierungsprozess einen Einfluss auf die Permeabilität hat. Um genügend grosse SOH-Stücke zu gewinnen,

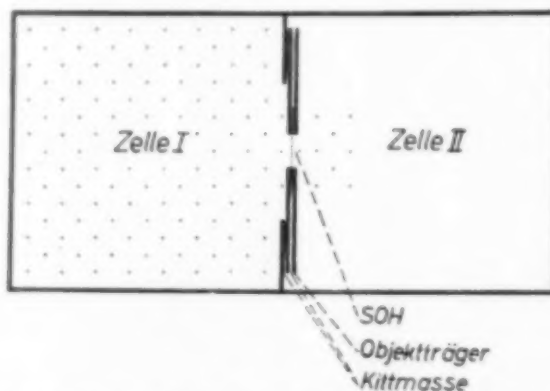


Abb. 6. Versuchsanordnung für Permeabilitätsuntersuchungen.

war eine kurze Vorfixierung erforderlich. Vergleichsuntersuchungen am Schalenhäutchen des Hühnereis—einer leicht im nativen Zustand zu gewinnenden Membran—ergaben, dass eine 5 std. Vorfixierung mit 96 % Alkohol und die anschliessende

Entmineralisierung in 2 % HCl bei +1°C keinen wesentlichen Einfluss auf die Permeabilität hat (SCHÜLE und LÜBBECKE, 1961).

Die Diffusionskammern waren durch einen genau dimensionierten Kanal miteinander verbunden, in dem das SOH ausgespannt war (Abb. 6); Zelle 1 enthielt die Testlösung, Zelle 2 destilliertes Wasser.

(a) Qualitative Untersuchungen

Bei den qualitativen Untersuchungen wurden nach 6, 12, 24 und 48 Std. Proben aus Zelle 2 entnommen und mit empfindlichen Nachweismethoden auf die Testsubstanz untersucht. Zur Vermeidung eines hydrostatischen Druckgefälles wurden gleichzeitig äquivalente Mengen aus Zelle 1 entnommen.

Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen zeigt Abb. 7:

Milchsäure	+	Ca ⁺⁺	+
HCl	+	PO ₄ ^{'''}	+
NaCl	+	Glucose	+
Glycin	+	Methylenblau	+
Asparaginsäure	+	Trypanblau	Ø
Cystin	Ø	Kongorot	Ø

Abb. 7. Qualitative Permeabilitätsuntersuchung am TSOH.

Untersucht wurden

Milchsäure, die im Rahmen der Säuretheorie als entmineralisierendes Agens diskutiert wird;

die Aminosäuren *Glycin* mit niedrigem, *Asparaginsäure* mit mittlerem und *Cystin* mit hohem Molekulargewicht, die im Rahmen der Chelationstheorie als entmineralisierende Stoffe angesehen werden;

Ca⁺⁺ und *Phosphationen*, die beim Abbau der Schmelzminerale entstehen;

Glucose, die als Nährstoff für eingedrungene Bakterien dienen kann;

Methylenblau mit Molekulargewicht 374 als Testsubstanz, die noch durch das SOH diffundiert, während die Testsubstanzen;

Kongorot und *Trypanblau* zurückgehalten werden.

(b) Quantitative Untersuchungen

Es wurde untersucht, ob zwischen der Permeabilität des SOH aus verschiedenen Entwicklungsstufen Unterschiede bestehen. Die Versuchsanordnung war gleich wie bei den qualitativen Untersuchungen (SCHÜLE und LÜBBECKE, 1961). Die diffundierte Testsubstanz wurde in verschiedenen Intervallen mit empfindlichen Methoden quantitativ untersucht. Abb. 8 zeigt, dass für alle geprüften Substanzen die Permeabilität vom PSOH über das SSOH zum TSOH abnimmt. Mit zunehmendem Alter nimmt also die Permeabilität ab.

Die Permeabilitätsuntersuchungen am vorsichtig entkalkten SOH zeigen, dass sowohl Milchsäure und Glucose, die im Rahmen der Säuretheorie eine Rolle spielen, als auch Aminosäuren (ausser Cystin), die als Chelatoren diskutiert werden, durch

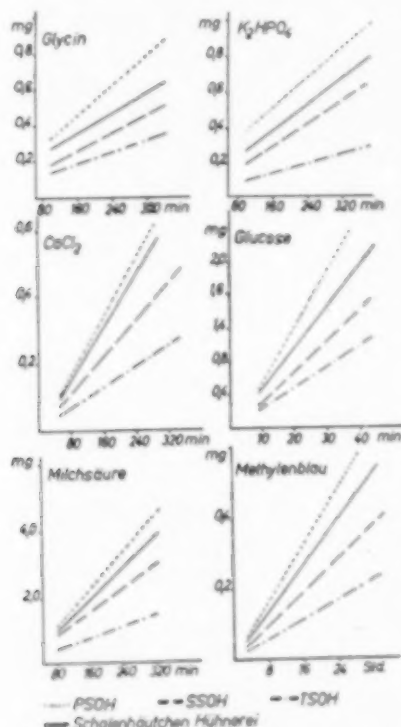


Abb. 8. Quantitative Permeabilitätsuntersuchung.

das SOH diffundieren können. Ca⁺⁺ und Phosphat-Ionen, die bei der Auflösung der Schmelzminerale entstehen, können durch das SOH abdiffundieren. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass das SOH eine Schutzfunktion für die Schmelzprismen erfüllt.

LITERATUR

- ASTBURY, W. T. 1938. Röntgenstrahlen-Abenteuer unter den Eiweisskörpern. *Kolloidzeitschrift* **83**, 130-139.
- BARNETT, R. J. und SELIGMAN, A. M. 1954. Histochemical demonstration of sulfhydryl and disulfide groups of proteins. *J. nat. Cancer Inst.* **14**, 769-792.
- BENNET, H. S. 1951. The demonstration of thiol groups in certain tissues by means of a new colored sulfhydryl reagent. *Anat. Rec.* **110**, 231-246.
- BERGGREN, H. 1946. The mineral metabolism in the dental hard tissue. *Acta radiol., Stockh.* **27**, 249.
- BLIX, G., FELIX, K., GRASSMANN, W. und TRUPKE, J. 1951. Eiweiss-Stoffe in FLASCHENTRÄGER, B. und LEHNARTZ, E.: *Physiologische Chemie*, Bd. 1. Springer, Berlin.

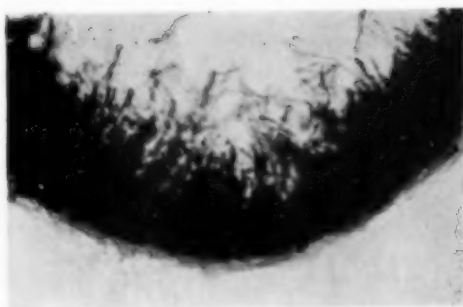


Abb. 1

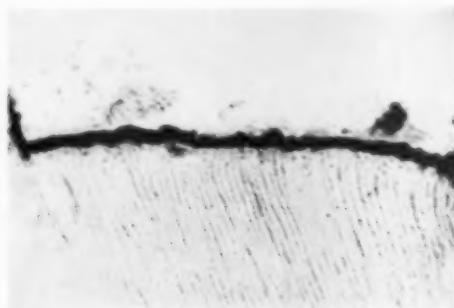


Abb. 2

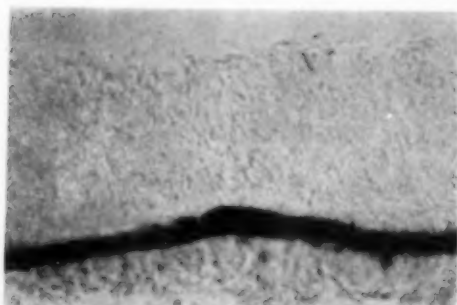


Abb. 3

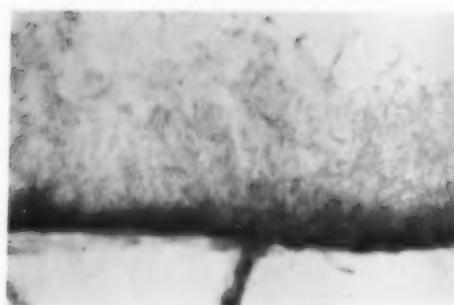


Abb. 5

Abb. 1. TSOH und Bakterienbeläge (Färbung nach Gram/Ernst).

Abb. 2. Tetrazoliumreaktion auf Cystin. TSOH +, Schmelzprotein -.

Abb. 3. Ferricyanidreaktion auf Cystein. TSOH ++, Schmelzprotein -, Bakterienbeläge -.

Abb. 5. Perjodsäure/Schiffreaktion am TSOH. TSOH ++, Bakterienbeläge ++.

Vol.
4
1961

- BLOCK, R. J. und VICKERY, H. B. 1931. The basic amino acids of proteins. A chemical relationship between various keratins. *J. biol. Chem.* **93**, 113-117.
- CHÈVREMONT, M. und FRÉDÉRIC, J. 1943. Une nouvelle methode histochemique de mise en évidence des substances à fonction sulfhydrile. *Arch. Biol., Paris* **54**, 589-605.
- DEMPSEY, E. W., SINGER, M. und WISLOCKI, G. B. 1947. The dye-binding capacity and other chemo-histological properties of mammalian mucopolysaccharides. *Anat. Rec.* **98**, 417-429.
- V. EBNER, V. 1902. *Köllikers Handbuch der Gewebelehre des Menschen*, Vol. III, S. 90. Leipzig.
- EULER, H. 1923. Der Epithelansatz in neuer Beleuchtung. *Vjschr. Zahnheilk.* **39**, 103-129.
- FRANK, R. 1949. Recherches sur la membrane de Nasmyth. *C.R. Soc. biol., Paris* **143**, 1243-1245.
- GOTTLIEB, B. 1921a. Der Epithelansatz am Zahne. *Dtsch. Mschr. Zahnheilk.* **39**, 142-147.
- GOTTLIEB, B. 1921b. Ätiologie und Prophylaxe der Zahnkaries. *Z. Stomatol.* **19**, 129-152.
- HALE, C. W. 1946. Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues. *Nature, Lond.* **157**, 802.
- HOTCHKISS, R. D. 1948. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.* **16**, 131-141.
- JOHNSON, P. L., HOFFMANN, H. und ROLLE, G. 1957. The Gram staining mechanism of cat tongue keratin. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 84-90.
- KLEES, L. und KLEES, K. 1958. Über die Regenerationsfähigkeit des Schmelzoberhäutchens. *Stoma* **11**, 58-76.
- KÖLLIKER, A. 1852. *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*, 1. Aufl. Leipzig.
- LOSEE, F. L. und HESS, W. C. 1949. The chemical nature of the proteins from human enamel. *J. dent. Res.* **28**, 512-517.
- MCMANUS, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Techn.* **23**, 99-108.
- MEYER, W. 1925. Strittige Fragen in der Histologie des Zahnschmelzes. *Vjschr. Zahnheilk.* **41**, 305-394.
- ORBAN, B. 1926. Schmelz- und Zahnoberhäutchen, Schmelzlamellen und Büschel. *Z. Stomat.* **24**, 136-167.
- ORBAN, B. und KÖHLER, J. 1924. Die physiologische Zahnfleischtasche. Epithelansatz und Epitheltiefenwucherung. *Z. Stomat.* **22**, 353-425.
- PINCUS, P. 1949. Human enamel protein. *Brit. dent. J.* **86**, 226-227.
- SAKAGUCHI, S. 1925. *J. Biochem., Tokyo* **5**, 25. Zit. n. PEARSE, A. G. E. 1960. *Histochemistry* (2nd Ed.). London.
- SCHÜLE, H. 1959. *Verh. Schleswig-Holst. Gesellschaft für Zahn-, Mund und Kieferheilkunde*, Kiel.
- SCHÜLE, H. 1960. Untersuchungen über die spontane Reparation oberflächlicher Schmelzdefekte. *Klin. Wschr.* **38**, 783.
- SCHÜLE, H. und LÜBBECKE, H. 1961. Die Permeabilität des Schmelzoberhäutchens. *Dtsch. zahnärztl. Z.* (erscheint in Kürze).
- SERRA, J. A. 1946. Histochemical tests for proteins and amino acids. The characterization of basic proteins. *Stain Techn.* **21**, 5-18.
- STEEDMAN, H. F. 1950. Alcian blue 8GS: A new stain for mucin. *Quart. J. micr. Sci.* **91**, 477-479.
- WESKI, O. 1922. Röntgenologisch-anatomische Studien aus dem Gebeit der Kieferpathologie. *Vjschr. Zahnheilk.* **38**, 1-39.

DIE STRUKTUR DES MENSCHLICHEN ZAHNSCHMELZES IM OBERFLÄCHENHISTOLOGISCHEN BILD (REPLICA-TECHNIK)

H. HEUSER

Zahnärztliches Institut der Philipps-Universität
Marburg an der Lahn, Deutschland

Zusammenfassung—Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Struktur des Zahnschmelzes vom oberflächenhistologischen Standpunkt aus (Replica-Technik) und nimmt zur normalen und anormalen Schmelzoberfläche, zur Frage der Grösse und dem Verlauf der Schmelzprismen sowie schliesslich zum strukturellen Bau der Schmelz-Dentin-Grenze Stellung.

Bewusst unberücksichtigt bleiben bei dieser Darstellung die pathologischen Verhältnisse des Zahnschmelzes im Zusammenhang mit der Zahnkaries und auch die Einwirkung des Fluors bzw. anderer Spurenminerale auf die Schmelzoberfläche.

In diesem Zusammenhang verweise ich auf meine früheren Arbeiten, die sich mit diesen Themen vom oberflächenhistologischen Standpunkt aus speziell beschäftigen.

Abstract—The object of this investigation was to study the structural variations and anomalies of surface enamel using a relief microscope with the replica technique.

With this technique we were able to study the size and course of the enamel prisms and to show that there is an increase in the diameter of each individual prism on its course to the enamel surface.

As regards the course of the enamel prism, our results were at variance with the views held by nearly all other workers who have studied this problem. We found that all prisms run in pre-determined curves from the dentino-enamel junction to the surface and that no enamel prisms follow a straight course.

Finally, our surface histological studies of the structural relationships in the region of the amelo-dentinal junction revealed a functional relationship between the ground elements of enamel and dentine which confirms our views on the strength and ability of this junction.

Résumé—On a étudié au début de ce travail les variantes structurelles et les anomalies de la surface adamantine du point de vue du relief microscopique (technique de répliques). En étudiant la taille et le trajet des prismes d'émail de la dent humaine par cette technique, nous avons pu confirmer l'opinion qui explique l'accroissement de la surface adamantine par l'augmentation du diamètre des prismes au cours de leur trajet vers la surface. En ce qui concerne le trajet des prismes nous pensons avoir démontré à l'encontre des opinions d'autres auteurs qui ont traité ce problème, que les prismes suivent une courbe régulière de la jonction adamantodentinaire à la surface. Nous pensons qu'il n'y a pas de portion rectiligne dans ce trajet.

Au niveau de la jonction adamantodentinaire mes recherches histologiques de surface montrent enfin qu'il y a un arrangement fonctionnel des éléments fondamentaux de l'émail et de la dentine, ce qui permet de tirer quelques conclusions sur la stabilité de cette zone de tissus durs.

DIE mir bei der diesjährigen Jahrestagung unserer Gesellschaft zugestellte Aufgabe, über "Die Struktur des menschlichen Zahnschmelzes im oberflächenhistologischen Bild (Replica-Technik)" zu sprechen, kann ich nur so auffassen, dass

ich in der mir zur Verfügung stehenden Zeit einzelne akute Probleme, mit denen wir uns in der letzten Zeit auf diesem Sektor beschäftigt haben, herausgreife und dieselben zur Diskussion stelle. Vom Standpunkt der Fluorforschung und Kariesprophylaxe interessiert uns zwangsläufig die Schmelzoberfläche der Zahnkrone strukturell am meisten. Ich will daher diese Teilfrage an den Anfang meiner Betrachtungen stellen, möchte jedoch betonen, dass ich mich hierbei auf das normale Oberflächenbild des Schmelzes und seine anormalen Abweichungen beschränken und nicht das pathologische Bild in den Kreis meiner Betrachtungen einbeziehen werde. Die äussere Oberfläche des menschlichen Zahnschmelzes stellt ein besonders dankbares Gebiet für die Replica-Technik dar, da wir hiermit zusammenhängende Oberflächenanteile des unveränderten Schmelzes histologisch untersuchen können.

Bei Untersuchungsreihen die den makroskopisch gesunden Zahnschmelz sowohl an extrahierten als auch an Zähnen in der Mundhöhle betreffen, finden wir sehr selten einmal eine völlig glatte vom Schneidekanten- bzw. Höckergebiet bis zur Schmelz-Zement-Grenze reichende Schmelzoberfläche, wie wir sie in Abb. 1 sehen. In der Regel zeigt das von der Schmelzoberfläche gewonnene Reliefbild mehr oder weniger deutlich sichtbar Perikymatien, welche in den einzelnen Kronenabschnitten eine unterschiedliche Breite und Gestalt besitzen, wie ich dieses zusammen mit PANTKE feststellen konnte.

Während an der Labialfläche der Schneidezähne die horizontal angeordneten Perikymatien wellenförmig verlaufen, sind sie an den Approximalflächen bogenförmig-konvex zum Zahnhals hin gestaffelt (Abb. 2), wobei noch hervorgehoben werden soll, dass im Bereiche der Schulter der Schneide- und Eckzähne die Perikymatien eine Unterbrechung erfahren. Diese Auffassung steht in einem gewissen Widerspruch zu der Annahme von PEDERSEN und SCOTT, dass die Perikymatien im allgemeinen parallel zur Schmelz-Zement-Grenze verlaufen. Dieses mag für die Molaren und Prämolaren zutreffen, hat jedoch keine Gültigkeit für die Schneide- und Eckzähne.

Besonders eindrucksvolle Reliefbilder erhalten wir von den nicht selten vorkommenden anomalen Oberflächenstrukturen des Schmelzes. Hier seien zunächst die von LENHOSSEK schon beschriebenen irregulären Perikymatien, welche PEDERSEN und SCOTT als "medium perikymatia" bezeichnen, genannt. Sie können die verschiedensten von der Norm abweichenden Bilder aufweisen (Abb. 3).

Eine sehr seltene, unseres Wissens bis dahin noch nicht beschriebene im zervikalen Kronen-Drittel an Molaren und Prämolaren gelegentlich vorkommende abnorme Struktur der Schmelzoberfläche stellt die Schmelz-Riffelung dar, bei der die irregulären Perikymatien noch zusätzlich von senkrecht zu ihnen verlaufenden Schmelzwülsten unterbrochen werden, wodurch das Bild einer Riffelung entsteht (Abb. 4). Es braucht vor diesem Gremium nicht besonders hervorgehoben zu werden, dass all diese anomalen Oberflächenstrukturen des menschlichen Zahnschmelzes kariesdiponierende Bedeutung besitzen. Zu den kariesfördernden Oberflächenstrukturen gehören auch die von SCOTT beschriebenen *Micropits*, deren Durchmesser nach PEDERSEN und SCOTT 25-50 Mikron betragen. Bei diesen Gebieten handelt es sich um zirkumskripte irreguläre Vertiefungen, welche häufiger an Molaren und Prämolaren

als an Schneide- und Eckzähnen vorkommen (Abb. 5). Sie scheinen durch Arrosion der sogenannten Schmelz-Tubercula—eine anormale Form der Schmelzoberfläche—zu entstehen.

Ausserdem soll in diesem Zusammenhang auch auf den nicht seltenen irregulären Verlauf der Schmelz-Zement-Grenze und die hiermit zusammenhängenden karies-disponierenden Faktoren hingewiesen werden. Bei einem Vergleich mit der Abb. 1, welche eine gerade verlaufende als "ideal" anzusprechende Schmelz-Zement-Grenze aufweist, sehen wir bei dem in Abb. 6 wiedergegebenen Reliefbild eine verworrene und zerklüftete Begrenzung zwischen Schmelz und Zement, welche dem leichteren Entstehen einer Zahnhalskaries zwangsläufig Vorschub leisten muss. Schliesslich möchte ich in diesem Zusammenhang noch auf ein Experiment meines Mitarbeiters PANTKE aufmerksam machen, welches die vielseitigen Möglichkeiten der Replica-Technik unter Beweis stellt.

Zur Herstellung des in Abb. 7 wiedergegebenen Replicas schliiff er einen oberen Eckzahn der Länge nach in einer von vestibulär nach palatinal verlaufenden Fläche an. Anschliessend wurde die Schlifffläche poliert und mit verdünnter Salzsäure geätzt. Von der so vorbereiteten Schlifffläche und der unbehandelten normalen Zahnoberfläche stellten wir dann in einem Arbeitsgang über die Kante hin ein Replica her, welches dann nach dem Abziehen zwischen Objektträger und Deckglas plattgedrückt wurde. Mit dieser Darstellung konnte der sichere Beweis der Relation zwischen Perikymatien und Retziusstreifen erbracht werden, indem wir die auf der linken Bildseite, d.h. auf der geätzten Fläche sichtbaren Retziusstreifen genau mit den Furchen zwischen den Perikymatien der normalen Schmelzoberfläche im rechten Bildteil korrespondieren sehen.

Wenn wir nun unseren Blick von der äusseren Schmelzoberfläche abwenden und uns mit der inneren Schmelzstruktur, soweit dieses die Reliefmikroskopie zulässt, beschäftigen wollen, so scheinen mir die Grösse und die Verlaufsrichtung der einzelnen Schmelzprismen besonders geeignete Problemstellungen für die Replica-Technik zu sein. Durch die von mir und meinen Schülern durchgeführten Untersuchungen konnten wir einerseits die bestehenden, auf anderen histologischen Verfahren basierenden Lehrmeinungen bestätigen, andererseits kamen wir aber auch, was namentlich die Verlaufsrichtung der prismatischen Substanz betrifft, zu einer ganz anderen Auffassung.

Zunächst lag der Gedanke nahe, sich vom reliefmikroskopischen Standpunkt aus auch mit der Grösse der Schmelzprismen in den einzelnen Schichten am menschlichen Zahn zu beschäftigen. Die heutige Lehrmeinung geht dahin, dass der Ausgleich des flächenmässigen Grössenunterschiedes durch eine Vergrösserung der einzelnen Schmelzprismen in ihrem Verlaufe zur Schmelzoberfläche hin erfolgt (RETZIUS, KOLLICKER, WALDEYER, DE TERRA, HANNOVER u.a.). Nach W. MEYER nehmen nicht nur die Prismen selbst, sondern auch die interprismatische Substanz auf dem Wege von der Schmelz-Dentin-Grenze zur äusseren Zahnoberfläche im Querschnitt zu. Die früher zum Teil auch von TOMES noch vertretene Meinung des Flächenausgleichs durch "supplementäre Fasern an der äusseren Schmelzseite" nämlich durch solche Prismen, welche nicht den ganzen Schmelz vom Dentin bis zur Oberfläche hin



Abb. 1. Völlig glatte Schmelzoberfläche ohne Perikymatien und Prismenrelief. Auch die Schmelz-Zement-Grenze zeigt keine Unebenheiten. S—Schmelz, Z—Zement.

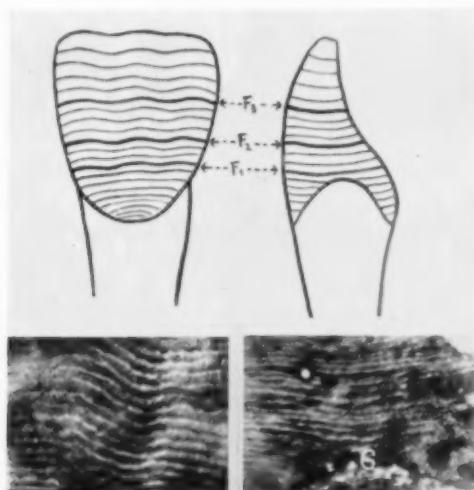


Abb. 2. Unterbrechung der Perikymatien im Bereiche der Approximalfläche eines oberen seitlichen Schneidezahnes. Bisweilen treffen die Perikymatien sogar senkrecht auf die Schmelz-Dentin-Grenze auf. G—Schmelz-Zement-Grenze.

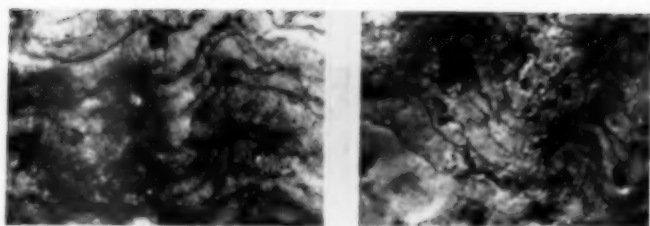


Abb. 3. Irreguläre Perikymatien vom mittleren Drittel eines unteren zweiten Molaren.

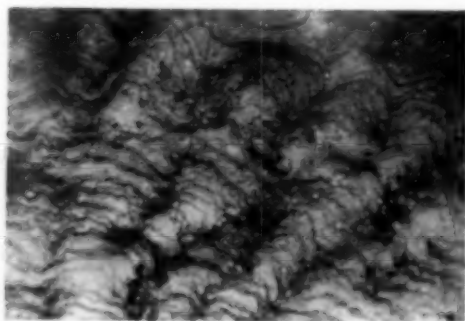


Abb. 4. Schmelzriffelung im Bereiche des zervikalen Drittels eines unteren zweiten Prämolaren. Neben dem unregelmässigen Verlauf der Perikymatien ist die dazu senkrecht stehende Wellenform des Schmelzes (Riffelung) gut zu erkennen.

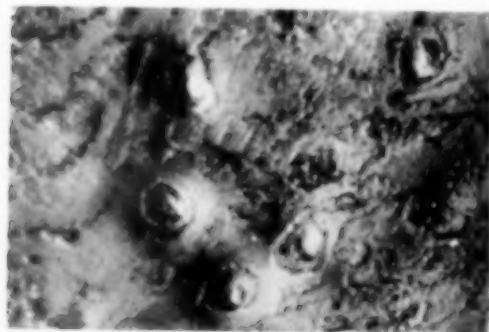


Abb. 5. Mikropits im reliefmikroskopischen Bild.

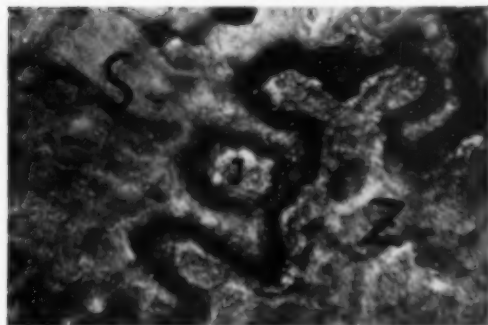
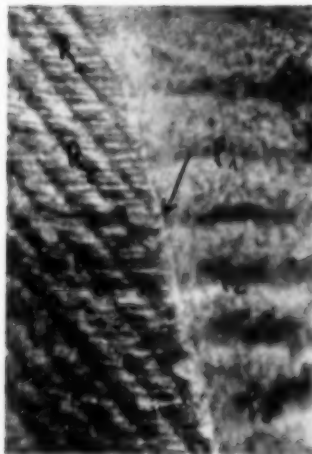


Abb. 6. Unregelmässige Schmelz-Zement-Grenze. S=Schmelz, Z=Zement, I=Zementinsel im Schmelz (Vergl. auch Abb. 1).

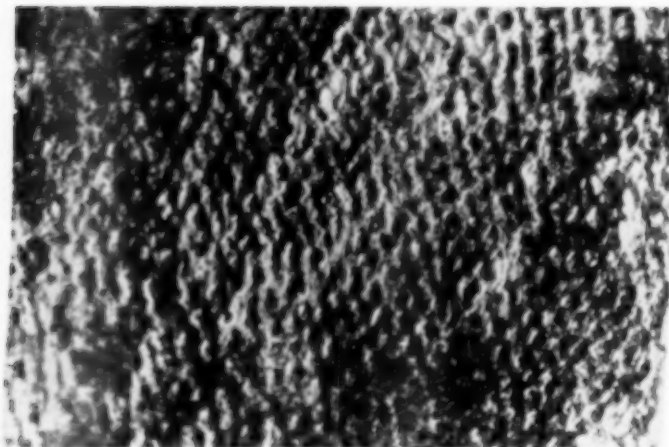


(a)

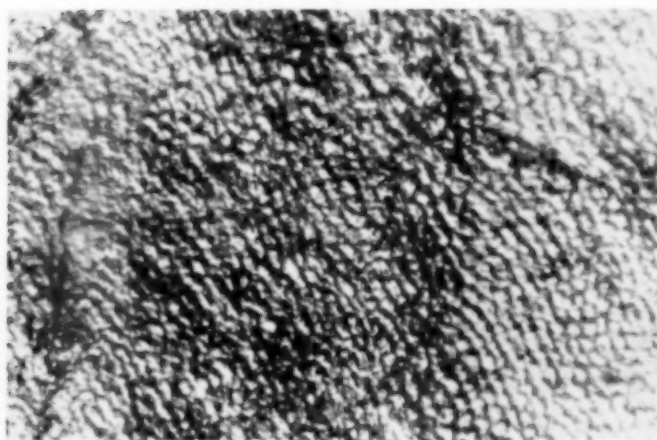


(b)

Abb. 7. Darstellung der Retziusstreifen (Verfahren nach PANTKE). Die Retziusstreifen (R) korrespondieren mit den zwischen den Schmelzwülstchen gelegenen Furchen (F). \angle =Zusammentreffen von R u. F.



(a)



(b)

Abb. 8. Reliefmikroskopische Darstellung der Grösse der Schmelzprismen. Die in verschiedener Querschnittstiefe, namentlich im Höckergebiet von Molaren, gewonnenen Replicas lassen die Grössenunterschiede der einzelnen Prismenquer-schnitte deutlich erkennen.

a—in der Nähe des Schmelzoberhäutchens gelegene Schmelzschicht.

b—tiefer, mehr zur Schmelz-Dentin-Grenze hin gelegene Schmelzschicht.

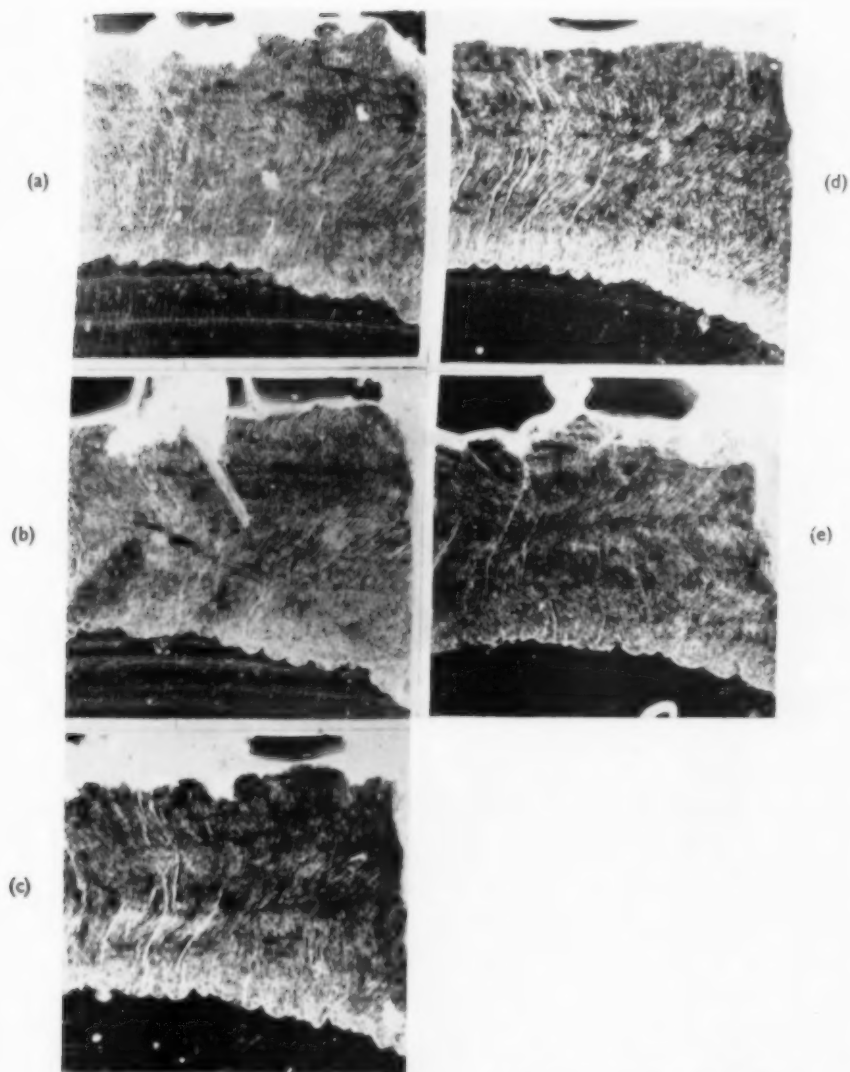


Abb. 9. Reliefmikroskopische Darstellung des Prismenverlaufes durch Querschnittsserien. Spiegelbildliche Wiederkehr des Kurvenverlaufes nach jedem vierten Bild der Serie bei einem Abstand von 16 Mikron zwischen den einzelnen Replicas (vergl. Abb. 9 a u. 9 e usw.).

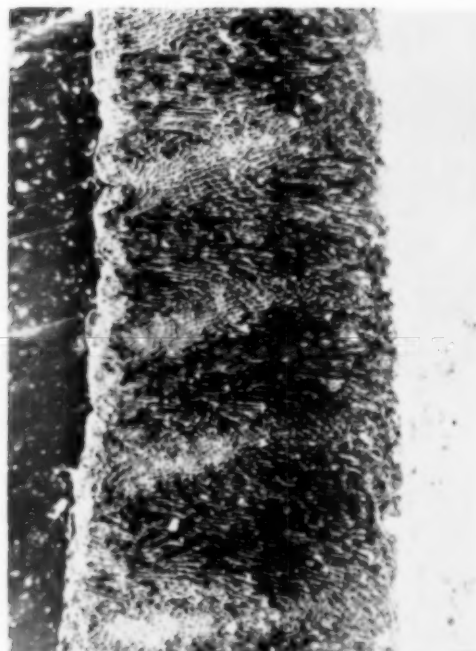


Abb. 11. Reliefmikroskopische Darstellung des Prismenverlaufes im Längsschliff. Die Streifen der quer angeschliffenen Prismen verlaufen nicht parallel zu den längs getroffenen Prismenabschnitten.

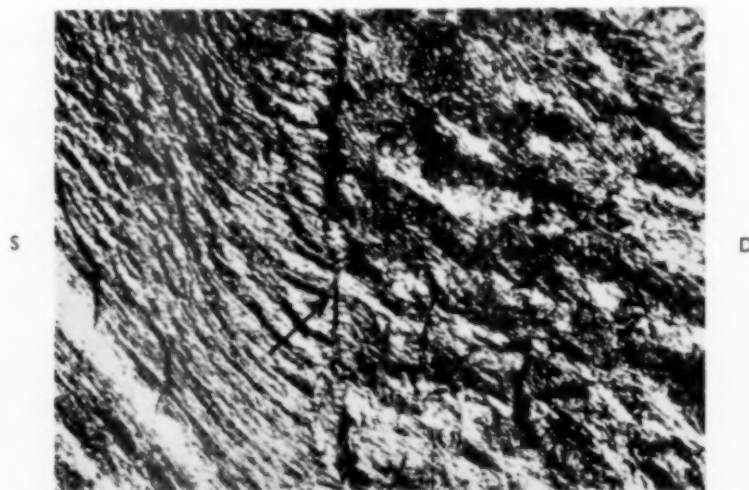
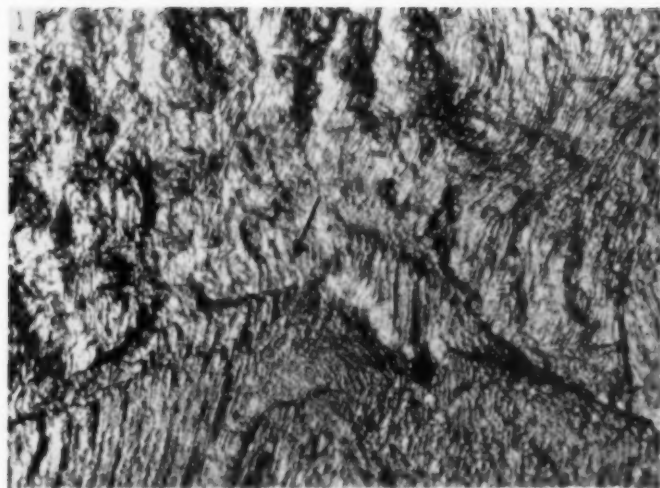


Abb. 14. Gleichgerichtetes Aufeinandertreffen von Schmelzprismen und Dentinkanälen im Seitenzahngebeiß eines menschlichen oberen Prämolaren (D=Dentin, S=Schmelz). Dort, wo die Dentinkanälen schräg auf die Schmelzschicht auftreffen, zeigen sie einen fast gleichgerichteten Verlauf mit den Schmelzprismen. Nicht selten ist auch ein S-förmiges Aufeinandertreffen von Dentinkanälen und Schmelzprismen zu beobachten (x).

S



D

Abb. 15. Buchtenreicher Verlauf der Schmelz-Dentin-Grenze im Höckergebiet eines menschlichen oberen Prämolaren. Im Gegensatz zum Seitenzahnbereich (vergl. Abb. 14) verläuft hier die Schmelz-Dentin-Grenze viel buchtenreicher. Trotzdem treffen auch hier die Schmelzprismen und die Dentinkanälchen gleichgerichtet aufeinander (✓).

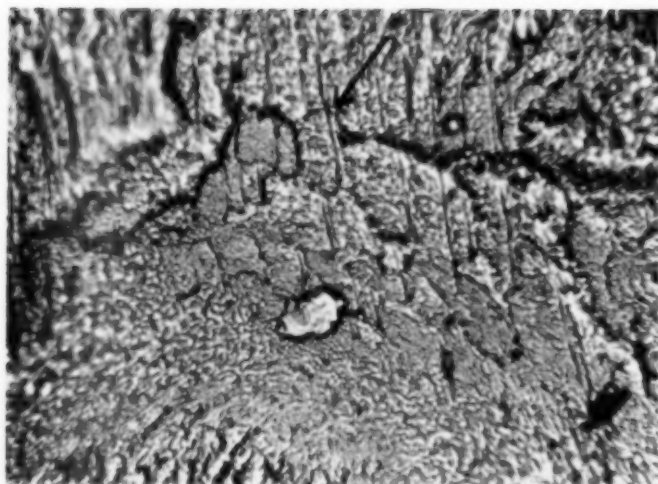
S



D

Abb. 16. Vom Dentin in die dentinnahe Schmelzschicht übergreifende Zapfen vom Höckergebiet eines menschlichen Prämolaren (S=Schmelz, D=Dentin). Bisweilen lässt der buchtenreiche Verlauf der Schmelz-Dentin-Grenze Dentinzapfen (✓), die in den Schmelzbereich vorspringen, erkennen. In diesen lässt sich aber auch das gleichgerichtete Aufeinandertreffen von Schmelzprismen und Dentinkanälchen nachweisen.

S



D

Abb. 17. Strukturalbild von der Schmelz-Dentin-Grenze im Höckergebiet eines menschlichen oberen Prämolaren (S=Schmelz, D=Dentin). Das Replica lässt deutlich in den Schmelzbereich übertretende Dentinkanälchen erkennen (*).

durchziehen, findet heute keine Zustimmung mehr. Auch die Theorie von der sogenannten Spaltung der Schmelzprismen lässt sich nicht mehr stützen. Selbst die gelegentlich auf Reliefbildern nachweisbare "Aufgabelung" eines Prismas dürfte kaum mit einer Spaltung desselben oder mit einer "supplementären Faser" (TOMES) identisch sein.

Die von mir durchgeführten experimentellen Untersuchungen basieren auf der Darstellung des Prismenreliefs von Schmelzschichten verschiedener Tiefe unter den gleichen mikroskopischen Bedingungen. Wenn man z.B. den Höcker eines Prämolaren oder Molaren anätzt, lassen sich die direkt unter der NASMYTischen Membran gelegenen Prismenköpfe freilegen und im replica-technischen Verfahren gut zur Darstellung bringen. Durch weiteres Ätzen, besser aber noch durch Abschleifen der primär angeätzten Fläche und erneutes Ätzen der Schlifffläche lässt sich dann eine tiefer gelegene Schmelzschicht erfassen. Auf diese Weise können dann weitere tiefer liegende Schichten dargestellt werden. Bei einem Vergleich der Grösse der einzelnen Prismen und der sie umgebenden interprismatischen Substanz lassen sich dann die Grössenunterschiede der Prismenquerschnitte unschwer feststellen. Je länger ein Prisma ist, um so deutlicher treten die Unterschiede in Erscheinung. Namentlich die Höckergebiete der Molaren eignen sich besonders gut für solche Untersuchungen, aber auch an den Seitenzahngebieten der Mahlzähne treten die Grössenunterschiede der einzelnen Prismenquerschnitte eklatant in Erscheinung (Abb. 8).

Wir ich schon erwähnte, haben wir bei den von uns in der jüngsten Zeit durchgeführten oberflächenhistologischen Untersuchungen uns auch mit dem Verlauf der Schmelzprismen befasst. Anhand von Replicaserien überprüfte ich zusammen mit meinem Mitarbeiter H. SCHMIDT die bis dahin gültige Auffassung von dem periodischen Wechsel gerader und gekrümmt verlaufender Schichten von Schmelzprismen, wie diese—von geringen Abweichungen abgesehen—von PREISWERK, LEHNER und PLENK, MAYER und ERASQUIN u.a. vertreten wird. Die Replicas wurden von Serien angeätzter Schriffe sowohl in achsialer als auch in querer Verlaufsrichtung zur Zahnachse hergestellt, wobei zur Schneidekante oder zum Höckergebiet hin entsprechend der Verlaufsrichtung der Prismen die Schliffebene für die einzelnen Schliffserien aus später noch näher zu erörternden Gründen etwas abgeändert wurde. Beim Vergleich von Längs- und Querschliffbildern lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. Auf den Längsschliffbildern sind zahlreiche Prismenquerschnitte und scheinbar gradlinig verlaufende Prismen zu sehen; dem gegenüber zeigen die von den angeätzten Querschliffen gewonnenen Replicas fast ausschliesslich einen Kurvenverlauf der Prismen.

Stellen wir nun die Replicaserie so her, dass die einzelnen Querschliffe von einem bestimmten Schmelzgebiet 16 Mikron auseinanderliegen, so lassen sich die in den Abb. 9 a–c wiedergegebenen charakteristischen Kurvenbilder ermitteln (vergl. Abb. 9). Die hier wiedergegebene Bildfolge stellt das Produkt einer Querschliffserie von einem oberen seitlichen Schneidezahn etwa 2,5 mm von der Schmelz-Dentin-Grenze mit dem oben genannten Schliffabstand von 16 Mikron dar. Aus den einzelnen Abbildungen erkennen wir eine gewisse Verschiebung des Kurvenverlaufes von einem Bild zum anderen. Schliesslich entsteht nach jedem vierten Bild der Serie ein Spiegelbild

des Kurvenverlaufes, so dass also die Abb. 9 a und e (b und f sowie c und g) spiegelbildähnlichen Charakter besitzen. Zwischen den hier zur Darstellung gelangten Schliffbildern müssten nun nach der bisher gültigen Auffassung vom Prismenverlauf Schliffe liegen, welche rein radiär verlaufende Prismen zeigen. Diese Replicas lassen aber auch nur Kurvenbilder erkennen, welche sich um so ähnlicher sind, je näher sie in der Serie aneinanderliegen.

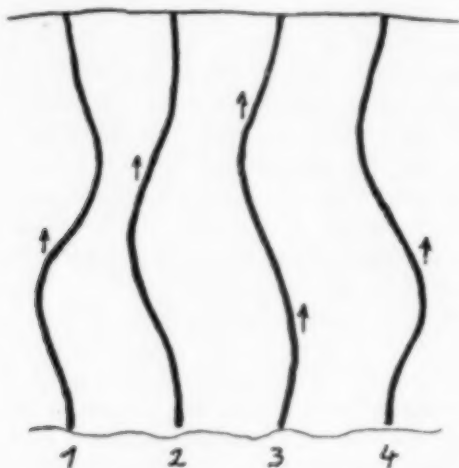


Abb. 10. Skizze unserer Auffassung vom Verlauf der Schmelzprismen in Querschliff-Replicas (vergl. Abb. 9). Die spiegelbildliche Wiederkehr nach jedem vierten Bild der Replica-Serie und die Abwanderung der Kurven-Bilder von der Dentinegrenze zur Schmelzoberfläche hin sind durch Einzelkurven und Pfeile (↑) dargestellt.

Wir müssen also somit zu der Feststellung gelangen, dass sich das Kurvenbild der Schliffserie stetig bis zur völligen spiegelbildlichen Umkehrung ohne Zwischenschaltung einer Schicht radiär verlaufender Schmelzprismen ändert.

Durch das genaue Studium der Kurvenbilder der einzelnen Schliffe gewannen wir den Eindruck, dass die Änderung des Kurvenbildes von Schliff zu Schliff einer ganz bestimmten Gesetzmässigkeit unterworfen ist. Bei der in der Abbildungsserie zur Anwendung gelangten Querschlifffolge von okklusal nach zervikal beobachteten wir eine deutliche Abwanderung der Kurven von der Dentinegrenze zur Schmelzoberfläche hin (Abb. 10 ↗).

Unsere Auffassung von dem verschobenen Kurvenverlauf der Schmelzprismen und dem Fehlen rein radiär ausgerichteter Prismenabschnitte im Sinne von LEHNER und PLENK u.a. in den Querschnittserien lassen sich durch das Studium der von Längsschliffen gewonnenen Replicas in wertvoller Weise stützen. Diese Längsschliffe (Abb. 11) erwecken zunächst den Eindruck, als lägen abwechselnd eine Schicht von gerade verlaufenden Prismen (längs angeschliffen) und eine mit gekrümmt verlaufenden (quer getroffen) übereinander. Bei genauer Durchmusterung derselben

sehen wir jedoch, dass die auf den Bildern anscheinend gerade verlaufenden Prismen nicht von der Schmelz-Dentin-Grenze bis zur Schmelzoberfläche durchlaufen, sondern die einzelnen Prismen beginnen oder enden vielmehr in einem Streifen quer angeschliffener Prismen. Daraus müssen wir folgern, dass die Streifen quer angeschliffener Schmelzprismen also nicht in der eigentlichen Verlaufsrichtung der Prismen liegen, sondern dieselben kreuzen, wie dieses in der in der Abb. 12 wiedergegebenen

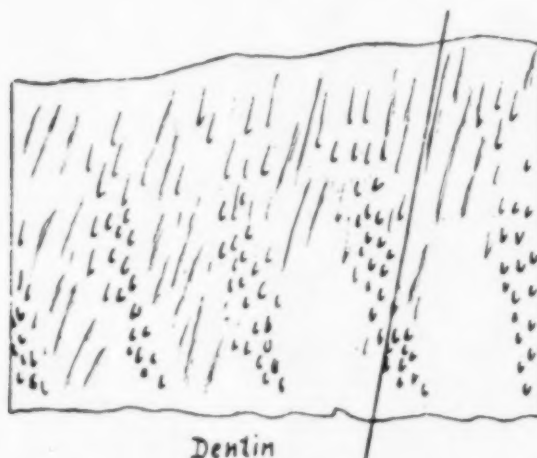


Abb. 12. Skizze vom Verlauf der Schmelzprismen im Längsschliff (vergl. Abb. 11). Im Längsschliffbild ist eine Linie, welche der von uns gewählten Ebene für die Querschliffserie (vergl. Abb. 9 u. 10) entspricht, eingezeichnet.

Skizze veranschaulicht ist. Wir glauben also annehmen zu dürfen, dass die im Längsschliff gradlinig erscheinenden Schmelzpartien die tangential angeschliffenen Kurvenanteile der Prismen selbst darstellen. Die an Längsschliffen mehr oder weniger deutlich je nach Lage des Schliffes auftretende Streifung steht in naher Beziehung zu den HUNTER-SHREGERschen Streifen. Diese Streifung ist am deutlichsten, wenn die Schlifffläche die Schmelzoberfläche nicht genau senkrecht trifft, so dass die nach der einen Seite ausbiegenden Kurvenabschnitte vorwiegend längs, die nach der anderen Seite ausbiegenden vorwiegend quer angeschliffen sind, wobei abschliessend noch einmal hervorgehoben werden soll, dass die quer angeschliffenen Prismen keine selbständigen Prismenabschnitte, sondern immer nur Kurvenanteile von Prismengruppen darstellen. Wie ausserdem an Längsschliffen gut feststellbar ist, verlaufen die scheinbar geraden Prismenbündel nicht parallel zu den Streifen der quer angeschliffenen Prismen, sondern sie münden stets in einen solchen Streifen ein. An dieser Erscheinung ist auch die Verschiebung der Kurvenfiguren von einer Verlaufebeine zu der ihr folgenden wiederzuerkennen.

Unsere Auffassung über den Verlauf der Schmelzprismen in den einzelnen Ebenen geht aus der in Abb. 13 wiedergegebenen Skizze hervor.

Ein sehr interessantes Untersuchungsobjekt für die Replica-Technik stellt schliesslich die Schmelz-Dentin-Grenze dar. Diese Zone nimmt in dem Hartsubstanzgefüge des Zahnes eine Sonderstellung ein. In den Arbeiten, die sich mit der Histologie der Schmelz-Dentin-Grenze befassen, ist immer wieder zu dem buchtigen Verlauf dieses Gebietes Stellung genommen und der Versuch gemacht worden, denselben zu erklären.

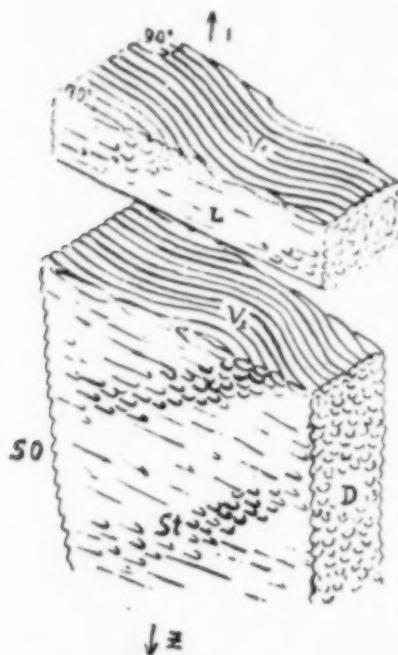


Abb. 13. Unsere Auffassung über den Schmelzprismenverlauf (dargestellt an einer Modell-Skizze von zwei Querschliffebenen mit spiegelbildlichem Kurvenverlauf). V_1 und V_2 stellen Querschliffebenen, welche in der Verlaufebeine der Prismen liegen, dar. Mit St. sind die quer angeschliffenen Prismen bezeichnet, die nicht parallel zu den Ebenen V_1 und V_2 verlaufen. Die Längsschlifffläche L trifft die Schmelzoberfläche SO nicht senkrecht, sondern in einem Winkel von 70° . Je steiler bestimmte Kurvenfiguren in die Längsschlifffläche einstrahlen, um so ausgeprägter werden die Prismenbündel quer angeschliffen. Die Streifen St entstehen durch Übereinanderschichtung dieser Queranschliffe. Der nach links unten gerichtete Verlauf der Streifen ist der Ausdruck der kontinuierlichen Verschiebung der Kurvenfiguren von der Dentinegrenze zur Schmelzoberfläche hin bei einer Schliffolge im Abstand von je 16 Mikron von inzisal (i) nach zervikal (z).

Die Ansicht eines grossen Teiles dieser Autoren, dass der buchtige Verlauf der Schmelz-Dentin-Grenze durch Resorptionsvorgänge, welchen das Dentin von seiten des sich bildenden Schmelzes unterworfen sein soll, wurde bereits durch die Arbeiten von GOTTIEB und ORBAN dahingehend widerlegt, dass die Grenze des inneren

Schmelzepithels schon unregelmässig verläuft, bevor es überhaupt zur eigentlichen Schmelzbildung kommt. Gegen die "Resorptionstheorie" sprechen auch die Feststellungen von LAMS und HELD, dass eine Anzahl von Dentinkanälchen über die eigentliche Schmelz-Dentin-Grenze hinaus zwischen die Ganoblasten heineinreichen und nach MEYER eine in der oberflächlichen Dentinpartie reichlicher verzweigte Schicht von Dentinkanälchen vorhanden ist. Schliesslich sahen wir bei unseren oberflächenhistologischen Untersuchungen auch niemals Schmelzsubstanz in das Dentinegewebe übergehen.

Wie ich an anderer Stelle bereits ausgeführt habe, kann ich mich auf Grund der vielseitigen Beobachtungen die wir mit der Replica-Technik von diesem Grenzgebiet machen konnten, des Eindrucks nicht erwehren, dass der buchtige Verlauf der Schmelz-Dentin-Grenze mit der Festigkeit und dem funktionellen Aufbau dieser Zone in unmittelbarem Zusammenhang steht. Diese Ansicht glauben wir durch folgende Beobachtungen stützen zu können: Namentlich bei den Prämolaren und Molaren unterscheidet sich der Verlauf der Schmelz-Dentin-Grenze im Seitenzahngebiet grundsätzlich von dem im Bereiche der Höcker. Im Seitenzahngebiet verläuft diese Grenze an dem in der Längsrichtung gespaltenen menschlichen Zahn annähernd gradlinig, wobei die Dentinkanälchen zum grossen Teil senkrecht auf die innere Schmelzschicht einmünden. Zwar treffen auch etliche Bündel schräg auf, jedoch zeigt sich dabei dann, dass sie mit den von der Schmelzseite her auftreffenden Schmelz-Prismen gleichgerichtet sind, wobei sich nicht selten ein S-förmiges Ineinandergreifen von Dentinkanälchen und Schmelz-Prismen beobachten lässt (Abb. 14). Solche Beziehungen können m.E. im übertragenen Sinne als funktionelle Ausrichtung der tragenden und belastbaren Substanz von Schmelz und Dentin gewertet werden.

Durch die an unseren Reliefbildern getroffenen Feststellungen, dass die Schmelz-Dentin-Grenze im Höckergebiet der Prämolaren und Molaren sehr buchtenreich verläuft, lassen sich ebenfalls die Festigkeit und die funktionelle Ausrichtung im Grenzgebiet der beiden Zahnhartsubstanzen Schmelz und Dentin nachweisen. Dort im Höckergebiet, wo nämlich die Schmelz-Prismen nach dem oben näher beschriebenen gewundenen Verlauf das Grenzgebiet erreichen (Abb. 15), ist die Festigkeit der Schmelz-Dentin-Grenze sehr wahrscheinlich nur durch einen zerklüfteten und buchtenreichen Verlauf gegeben. Dort sehen wir reguläre Dentinzapfen in die Schmelzsubstanz übergehen. In diesen zapfenförmigen Gebilden lässt sich ebenfalls wieder die im Sinne einer funktionellen Ausrichtung nachweisbare Anordnung des Überganges von Schmelz- und Dentinsubstanz erkennen (Abb. 16).

Hierbei können wir—besser noch am Strukturalbild als am Reliefbild—auch einzelne in den Schmelzbereich übergehende Dentinkanälchen nachweisen (Abb. 17). Ihnen kommt m.E. nicht nur eine Bedeutung im Hinblick auf die Ernährung des Zahnes zu (SMREKER), sondern in ihrer funktionellen Ausrichtung glaube ich auch eine gewisse Stabilität der Schmelz-Dentin-Grenze erkennen zu können, zumal auch hier weitgehend der organische Bestandteil des Dentins beteiligt ist.

Zweifellos spielt die organische Substanz für die Stabilität der Grenzzone eine grosse Rolle. Die Erfahrung, dass am ausgetrockneten Zahn sich der Schmelz bisweilen unschwer schalenartig vom Dentin löst, lässt zwangsläufig erkennen, dass

die organische Substanz den grössten Anteil für die Festigkeit der Schmelz-Dentin-Grenze liefert. Wir sind jedoch der Auffassung, dass ohne die funktionelle Ausrichtung der organischen und auch der anorganischen Substanz der Grundelemente der beiden Hartsubstanzen sowie der Verzapfung dieser ineinander das erforderliche Maximum der Festigkeit des Grenzgebietes an dem in Funktion stehenden Zahn nicht erreicht würde.

Schliesslich erfährt meine Auffassung dadurch noch eine besondere Stütze, dass unsere von der inneren Schmelzoberfläche der abgesprengten Schmelzanteile gewonnenen Reliefbilder den Nachweis erbringen, dass die namentlich in den Höckergebieten in den Schmelz vorspringenden Dentinzapfen bei dem Absprengungsvorgang frakturieren und in der Schmelzschale verbleiben.

CHANGES IN THE ENAMEL SURFACE IN CASES OF EROSION A REPLICA STUDY

F. MANNERBERG

Royal Dental School, Malmö, Sweden

Abstract—By using the replica method to study the tooth surface it was shown that in cases of erosion with an enigmatic etiology the surface appeared without any perikymata pattern and scratches were rare. The prism ends were readily recognized and appeared to be hollowed out in the region involved, the surface resembling a honey-comb. This gave the characteristic appearance of the tooth surface in cases of "manifest" erosion. It may be possible to diagnose—by means of the replica method—such cases and investigate if there is any difference in the composition of the saliva in these cases compared with cases which according to the replica show a more normal appearance with scratches and no hollowed out prism ends.

Résumé—Lorsqu'on utilise la technique des répliques pour étudier la surface de l'émail dans le cas d'érosion dont l'étiologie est inconnue, la surface apparaît sans structure de périkymaties et les rayures sont rares. On reconnaît bien l'extrémité des prismes et elles semblent être vidées de leur substance dans cette région. La surface ressemble à des nids d'abeilles, même dans les rayures. Ceci donne caractéristique de la surface dans les cas d'érosion "manifestes".

Les sillons provoqués par le brossage disparaissent normalement après un certain temps. On peut supposer que cette "réparation" est due à la précipitation d'une substance inorganique d'origine salivaire dans ces sillons. Dans les cas d'érosion "manifestes" il ne semble pas qu'il y ait une telle précipitation. Ainsi l'émail peut être exposé à l'action durable d'agents mécaniques et chimiques. Il est ainsi possible par la méthode des répliques de faire le diagnostic de tels cas et de rechercher s'il y a une différence dans la composition de la salive chez les sujets présentant ces cas ou bien ceux d'une apparence plus ordinaire.

Zusammenfassung—Bei Verwendung der Replica-Methode zur Untersuchung der Zahnoberflächen konnte gezeigt werden, dass bei Erosionen mit rätselhafter Ursache auf der Zahnoberfläche keine "perikymatischen" Zeichnungen und nur wenige Kratzer zu erkennen sind. Die Prismenenden waren gleichmässig und erschienen in dem betreffenden Bezirk ausgehöhlt; die Oberfläche hatte auch in den Kratzern ein wabenförmiges Aussehen. Das entspricht dem charakteristischen Bild einer Zahnoberfläche in Fällen von "manifesten" Erosionen.

Schrammen, die auf der Zahnoberfläche durch die Zahnbürste hervorgerufen werden, verschwinden normalerweise nach einiger Zeit. Es kann angenommen werden, dass der reparative Effekt durch eine Ausfällung von anorganischen Substanzen des Speichels in die Schrammen zustande kommt. Bei manifesten Erosionen scheint eine solche Ausfällung nicht zu erfolgen. Der Schmelz ist hierbei möglicherweise weiteren mechanischen und chemischen Einflüssen ausgesetzt. Es sollten weitere Fälle dieser Art mit der Replica-Methode festgestellt werden, um zu untersuchen, ob hier Unterschiede in der Zusammensetzung des Speichels zu finden sind, wenn diese mit jenen Fällen verglichen werden, die bei der Replica-Technik ein normales Aussehen zeigen.

EROSION is a local loss of tooth substance which can occasionally be observed clinically, particularly in the buccal surfaces in the anterior teeth. The shape varies from flattened surfaces to figured or irregular depressions. The base is polished and hard, which differentiates the erosion from caries.

The frequency of erosion is relatively low, but it is well known to dental practitioners (Fig. 1).

The etiology of erosion is not properly understood, and many theories have been advanced to explain it. A widely accepted theory is that the loss of substance is due to chemical disintegration of the enamel, which renders affected area susceptible to abrasion. The differentiation from abrasion has also been confused by the fact that abrasion and erosion often are simultaneous. As is well known from clinical reports and animal experiments an excessive consumption of citrus rich fruits or juice may cause a progressive loss of the enamel. There are, however, cases where the etiology may seem enigmatic and in these cases other explanations such as loss of substance through secretions from labial glands, traumatic occlusion, "gouty diathesis" and psychosomatic factors have been considered probable.

The available literature does not reveal any investigation made with the replica method of studying the microscopical appearance of tooth surfaces in cases of erosion.

First some notes about the interpretation of replicas. If a shadowed replica is photographed and a copy made of the negative film, the copy will show the same picture as may be seen on inspection of the replica in the microscope.

Fig. 2 (a) shows an intact tooth surface in which a scratch was made before the replica was taken. The replica was shadowed with the incisal edge nearest to the wire filament and the print was placed with the incisal part upwards.

This figure gives the impression that light is falling in towards the tooth surface from the upper end. Thus a scratch really looks like a furrow and other furrows and elevations are readily recognized as such. The interpretation of replicas is facilitated considerably.

Likewise in all figures the incisal edge is placed upwards and the picture gives a good illustration of the tooth surface. The replicas in Figs. 2 (b) and 2 (c) were turned 90° and 180° respectively when shadowed. They look confusing and it is impossible to interpret between elevations and furrows.

It was much more difficult to make good replicas *in vivo* of eroded surfaces than of clinically intact surfaces. The replica adhered more firmly to the surface and due to the uneven surface it was difficult to obtain replicas free from folds.

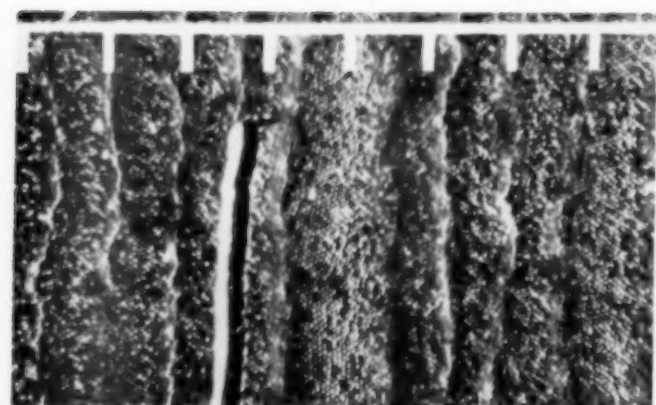
Examination of replicas from tooth surfaces where the erosion seemed to be at an active stage—most common in young people 20–30 years old and more common in females than in males—shows surfaces resembling a honey-comb. The surface is pitted and each pit corresponds to a prism end and is about 6 μ in diameter. Fig. 3 shows a picture of a deep erosion where the loss of substance has extended into the dentine. The enamel shows a pitted appearance and a few scratches but no perikymata. The dentine, however, is very scratched, mostly horizontally.

Fig. 4 is a higher magnification of the same erosion where the pitted appearance of the enamel and the scratched dentine can be better observed.

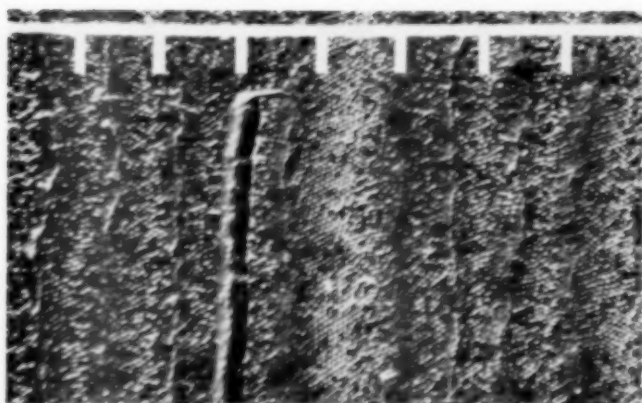
CHANGES IN THE ENAMEL SURFACE IN CASES OF EROSION



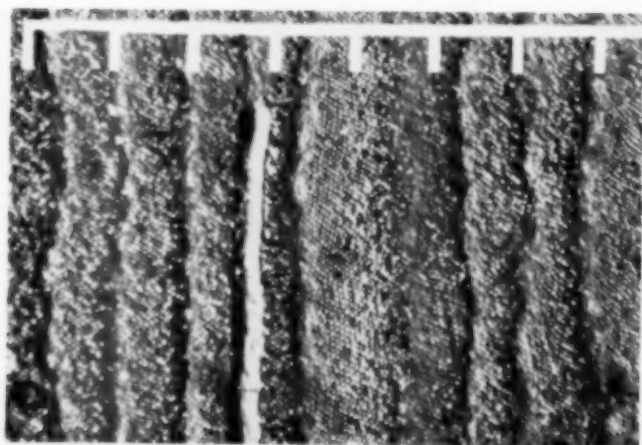
FIG. 1



(c)



(b)



(a)

FIG. 2

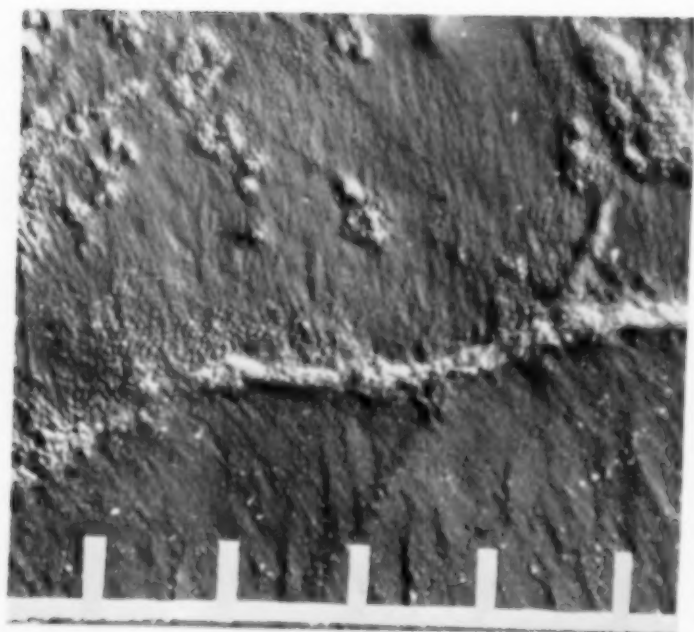
CHANGES IN THE ENAMEL SURFACE IN CASES OF EROSION



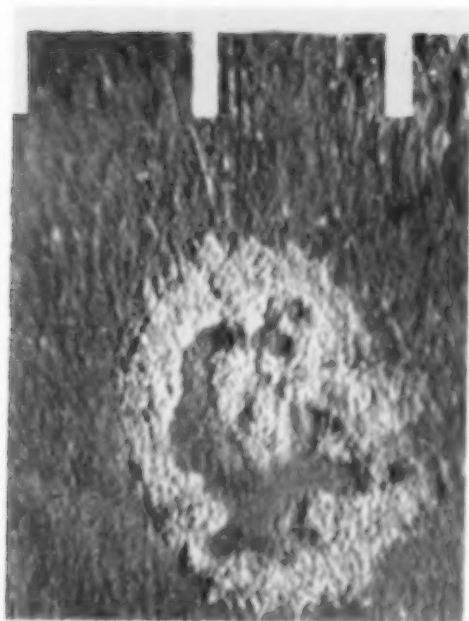
Fig. 4



Fig. 3



(a)



(b)

FIG. 5

CHANGES IN THE ENAMEL SURFACE IN CASES OF EROSION

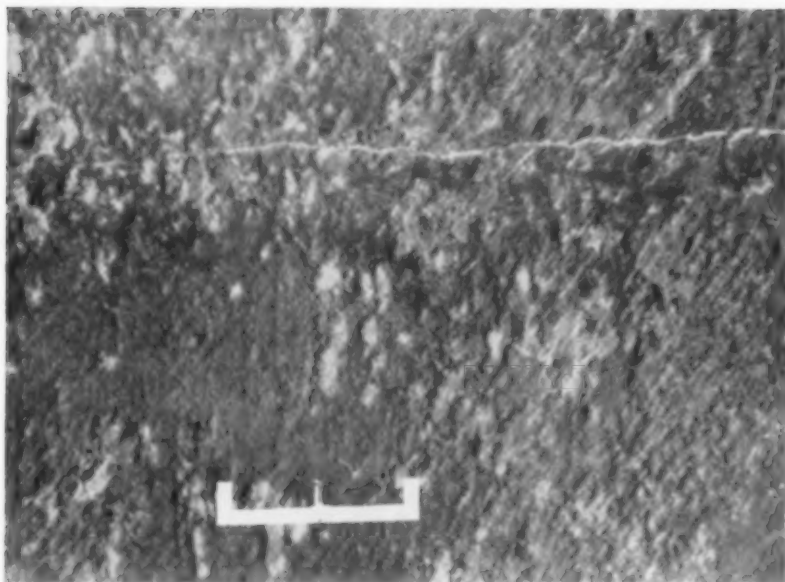


FIG. 7

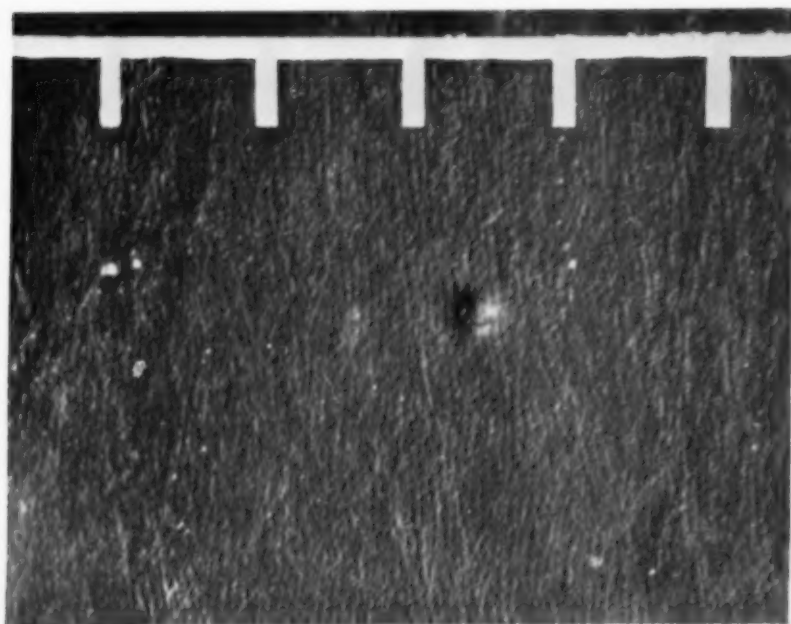


FIG. 6

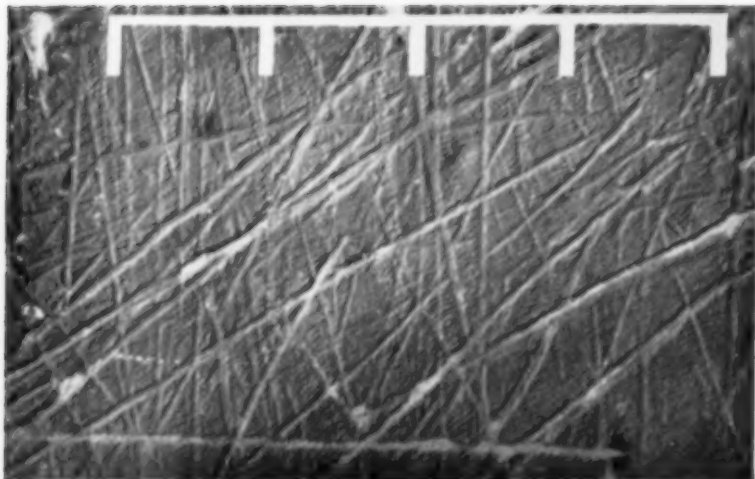


FIG. 9

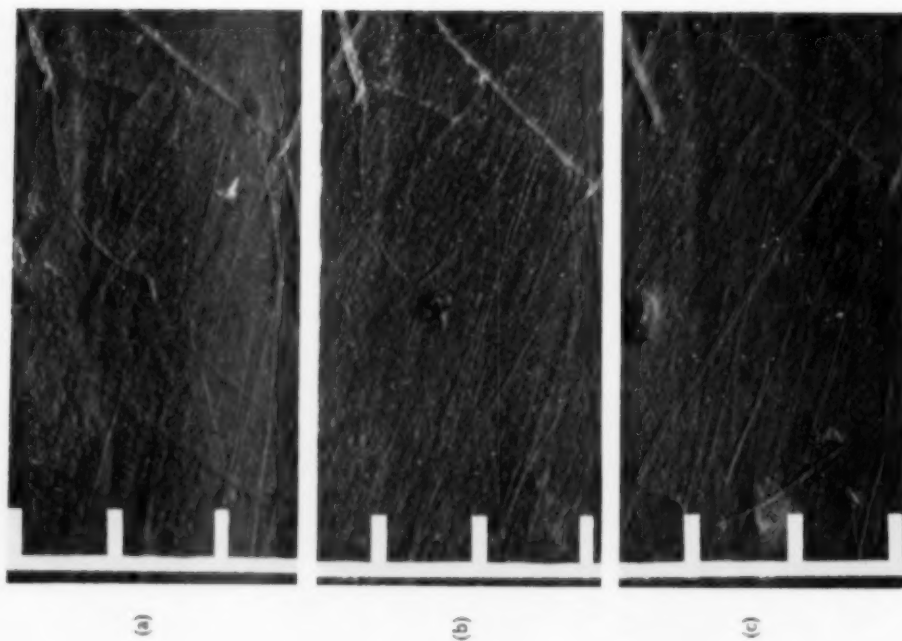


FIG. 8

CHANGES IN THE ENAMEL SURFACE IN CASES OF EROSION

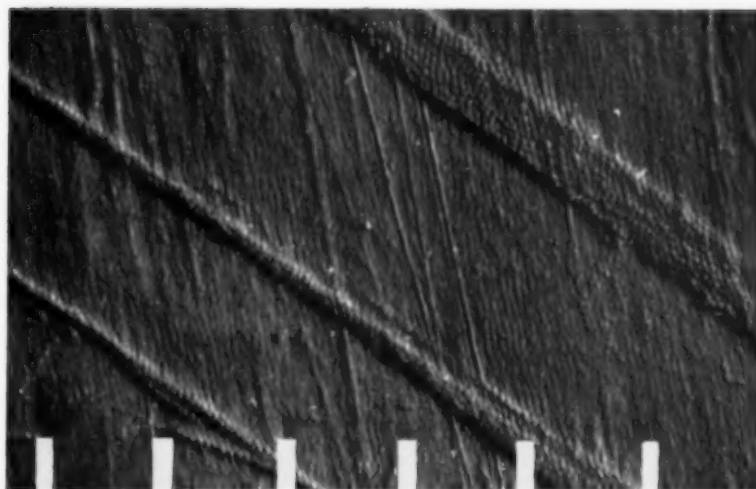


Fig. 11



Fig. 10

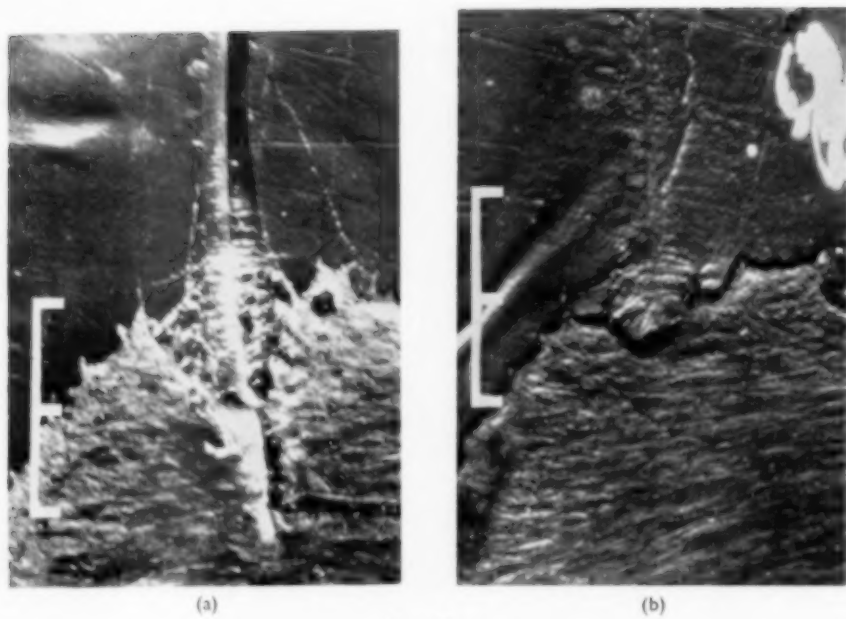


FIG. 12

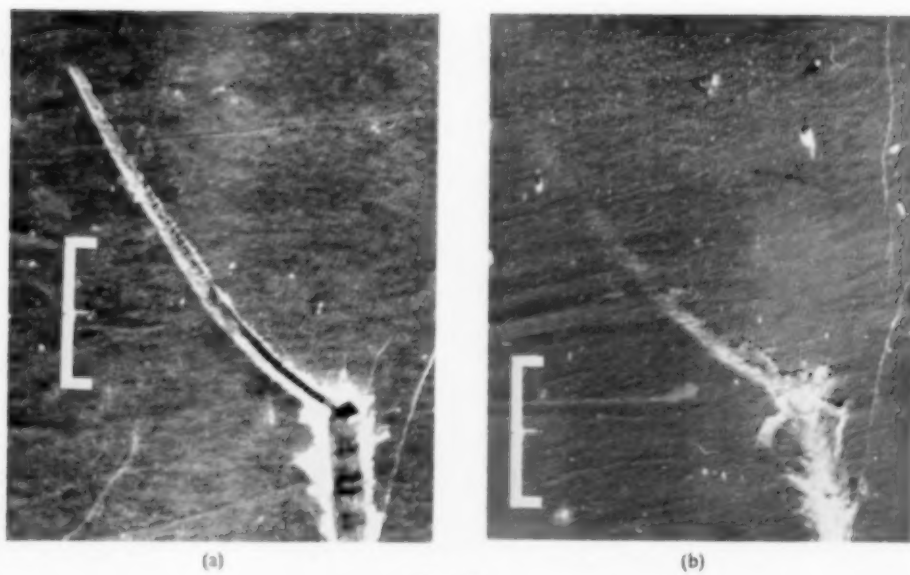


FIG. 13

The erosions often seem to start in small areas where a kind of barrier is broken through as can be seen in Fig. 5 (a). The erosion has reached the dentine to the left. In the enamel a few larger pits are recognized where the prism ends are visible. Fig. 5 (b) shows a higher magnification of one of the pits.

This type of surface has been named "manifest" erosion.

In adjacent parts of the tooth surface (Fig. 6) the prism ends are only faintly visible and other characteristics are not recognized. The erosion does not seem to be in an active stage and it has therefore been called "latent" erosion. It is, however, not always possible to draw a sharp distinction between manifest and latent erosion. The latent part is usually situated incisally to the manifest erosion.

Some patients with clinical erosion do not show the typical hollowed-out appearance on the tooth surface anywhere. A perikymata pattern is missing and a typical picture with larger pits 50–200 μ in diameter is observed. No prism ends can, however, be recognized in the floor of these larger pits. Fig. 7 shows the appearance of the tooth surface of a 45 years old female with a clinical erosion. The area does not show any hollowed-out prism ends. According to the patient, the erosion had not changed its appearance or extent during the last 10 years. The surface as seen from the replica gives the impression of a latent erosion. It may thus appear possible that an earlier manifest erosion can become latent.

Scratches on the tooth surface caused by tooth brushing normally disappear after some time. It can be presumed that this reparative effect is due to precipitation of an inorganic substance from saliva into the floor of the scratches.

Fig. 8 (a) is a picture of a case where several scratches in different directions can be seen. After 6 weeks (Fig. 8 b) some of the scratches have disappeared and after six months (Fig. 8 c) most of the old scratches are gone but new ones have come instead. The disappearance is not due to abrasion or erosion of the surface but to precipitation of inorganic substance into the scratches. Thus the prism ends and perikymata pattern visible in an undamaged tooth surface will gradually disappear and finally only a scratched surface, as in Fig. 9, may be seen. As was mentioned this is what normally can be observed on the tooth surface *in vivo*, the scratches usually being caused by intensive toothbrushing. In cases of erosion no such reparative effect can be observed. No precipitation of inorganic substance into the scratches seems to take place. Thus also the scratches show prism ends as in Fig. 10.

Fig. 11 shows a case where three scratches were made in the surface 1 year before the replica was taken. The scratches were not filled with inorganic substances but hollowed out as the rest of the surface.

In Fig. 12 (a) an erosion case is seen, where an engraved mark goes from the enamel into the dentine. After 6 weeks (Fig. 12 b) the loss of substance is considerable. In the enamel the hollowed out appearance of the surface is observed also in the scratch.

Figs. 13 (a) and (b) show another erosion case with an engraved mark with an interval of 3½ months. In the lower part the scratch is filled with plaque material (Fig. 13 b) which could not be removed from the surface before taking the replica. In the upper part where the scratch is clean, prism ends are seen in the bottom.

In none of these cases does the erosion seem to be due to excessive consumption of citrus fruits or any other acid ingestion. Rather, the cause seems to be enigmatic.

It was mentioned earlier that a repair by means of precipitation of inorganic material will normally make the scratches in the tooth surface disappear. The inorganic material is most probably calcium phosphate. This line of thought is based on the fact that the saliva always has a high content of calcium and inorganic phosphate with a strong tendency to microcrystalline precipitation.

This tendency varies widely and may probably depend upon the calcium and inorganic phosphate content of the saliva, the pH and buffer capacity of the unstimulated and stimulated saliva, the viscosity and mucin content, the bacterial flora and probably a number of other factors. The tendency to precipitation of calcium salts may thus vary from one person to another but in manifest erosion cases this reparative effect appears to be absent. The rapid loss of tooth substance in case of erosion could thus most probably be explained by the fact that if no substance is precipitated from the saliva into the surface, this surface will steadily be exposed to further mechanical or/and chemical agents.

By means of the replica method it is possible to diagnose manifest erosion cases with an enigmatic etiology. The saliva of such persons should be the subject of an investigation where all important factors are determined and compared with the corresponding values of saliva from persons with a normal tooth surface with respect to the replica appearance. That would give a new approach to the problem of the cause of erosion.

REFERENCE

- MANNERBERG, F. 1960. Appearance of tooth surfaces as observed in shadowed replicas. *Odont. Revy. Suppl.* 6, 1-116.

EIN BEITRAG ZUR MORPHOLOGIE DER INTERGLOBULARRÄUME IM VERKALKTEN DENTIN UND IHR NACHWEIS NACH DER ENTKALKUNG

H. SCHMIDT

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Martin-Luther-Universität
in Halle (Saale)

Zusammenfassung—Die Interglobularräume treten im verkalkten Dentin vorwiegend als spaltförmige und flächig-räumliche Gebilde in Erscheinung, die in verschiedenen Raumebenen verlaufen.

Aufgrund der Untersuchungsbefunde wird angenommen, dass es sich um echte Hohlräume handelt. Die Interglobularräume sind nach der Entkalkung und metachromatischen Färbung in ihren Umrissen als definierte morphologische Gebilde sichtbar.

Eine direkte räumliche Beziehung zwischen Dentinkanal und Interglobularraum wurde nachgewiesen.

Abstract—The interglobular cavities in calcified dentine are mainly gap-type, laminar and spatial, in various space-planes.

Based on experimental results, it is assumed that the cavities are real pore spaces. The interglobular cavities are visible as defined morphologic structures after they have been decalcified and meta-chromatically coloured.

A direct spatial connexion has been proved between dentinal tubule and interglobular cavity.

Résumé—Les cavités interglobulaires paraissent dans la dentine calcinée surtout sous la forme de fentes et d'espaces plates situées dans des plans variés dans l'espace.

Fondé sur les résultats d'essais on croit que ce sont des cavités véritables. Les cavités interglobulaires deviennent visibles sous la forme d'image morphologiques dédénés après la décalcination et la colorisation métachromique.

Une connexion directe a été démontrée entre le canal de dentine et les cavités interglobulaires.

UNTER VERWENDUNG eines metachromatischen Farbstoffes war es gelungen, das Globulardentin und andere Dentinstrukturen reproduzierbar histologisch zu erfassen (SCHMIDT, 1959a, b). Bei den damals untersuchten Schnitten entkalkter menschlicher Zähne konnte festgestellt werden, dass die Globuli fast regelmässig von im histologischen Bild weisslichgelblich oder bläulich erscheinenden, meist peripherwärts angeordneten, halbmondartigen Gewebsbezirken umgeben sind, in denen wiederum scharf begrenzte, teils spaltförmige, teils flächig-räumliche Gebilde auftreten.

Es musste damals offen bleiben, für welches dieser beiden Gebilde oder wie weit für beide zusammen der vorwiegend von Zahnschliffen her bekannte, in der Literatur umstrittene Begriff der Interglobularräume angewendet werden durfte.

Um die Unsicherheit in der Einordnung zum Ausdruck zu bringen, wurden diese Gebilde damals mit der nicht sehr schönen Bezeichnung "Interglobularraumgebiete" belegt.

Die nunmehr durchgeführten Untersuchungen galten neben einer etwas eingehenderen morphologischen Betrachtung der Interglobularräume im verkalkten Dentin vor allem der Frage, welcher Anteil der "Interglobularraumgebiete" im verkalkten Dentin sichtbar ist.

MATERIAL UND METHODEN

Für die Untersuchungen wurden aus kieferorthopädischer Indikation extrahierte und andere operativ entfernte, kariesfreie menschliche Zähne verwendet, die mit einer Diamantscheibe unter ständiger Kühlung in buccopalatinaler bzw. lingualer Richtung in Längsschliffe zerlegt wurden.

Von jedem untersuchten Schliff bzw. Schliffstück, meist mit einer Dicke von etwa 0,050 mm, wurden zunächst photographische Aufnahmen von den interessierenden, in ihrer Lokalisation eindeutig festgelegten Interglobularräumen angefertigt.

Sodann wurde mit n HCl bei Zimmertemperatur entkalkt. Nach der Wässerung in dest. Wasser wurden die Präparate metachromatisch gefärbt.

ERGEBNISSE

Die an den Längsschliffen erhobenen Befunde zeigen zunächst, dass bei den innerhalb des Kronen- und Wurzeldentins auffindbaren Interglobularräumen grundsätzlich zwei morphologisch unterschiedliche, häufig ineinander übergehende Formen vorherrschen.

Einmal sind es (Abb. 1), spaltförmige Gebilde, die grösstenteils halbkreisartig gekrümmt verlaufen, zum anderen sind es flächige Formen (Abb. 2), die ebenfalls von bogenförmigen, mit der Konvexität der Fläche zugewandten Linien umfasst werden. Viele dieser flächigen Gebilde gehen, wie auch aus Abb. 2 ersichtlich ist, in die Spaltform über.

Nicht immer gelingt es, die Interglobularräume scharf abzubilden, da sie innerhalb verschiedener Raumebenen verlaufen bei gleichzeitig wechselnder Form.

Beim Studium des Verlaufs der Dentinkanälchen in diesen Gebieten ergeben sich recht wechselhafte Bilder.

Häufig möchte man meinen, dass die Dentinkanälchen diese Gebiete durchziehen.

Aber es finden sich Anhaltspunkte dafür, dass zumindest ein Teil von ihnen (Abb. 3) am Rande nicht sehr tiefer, mit ihrer Fläche in der Verlaufsrichtung der Kanälchen liegender Interglobularräume abbiegt und sie auf diese Weise umgeht.

Auch kann, wie es aus Abb. 2 ersichtlich ist, bei flächigen Interglobularräumen die Kanälchenzeichnung weitgehend fehlen.

Aus einem anderen Präparat, in dessen Übersichtsbild nur ein einziger Interglobularraum mit Sicherheit nachweisbar ist (Abb. 4), ergeben sich weitere, interessante Hinweise für das Verhalten der Dentinkanälchen.

Bei stärkerer Vergrösserung (Abb. 5 und 6) findet sich ein etwa rechteckiger Interglobularraum, der bei scharfer Einstellung der Oberfläche (Abb. 5) noch nicht in

seiner vollen Ausdehnung erfasst wird, wie die Aufnahme (Abb. 6) mit dem um etwa $3\ \mu$ gesenkten Tubus beweist.

Aus einem Vergleich der jeweils identischen, mit gleichen Nummern versehenen Dentinkanälchen in beiden Bildern lässt sich schliessen, dass der Interglobularraum in Abb. 5 offenbar noch von einer dünnen Gewebsschicht bedeckt ist, besonders erkenntlich am Verhalten der Kanälchen 3 und 6, die in Abb. 5 den Interglobularraum zu durchziehen scheinen, bei voller Scharfstellung des Interglobularraumes aber nicht mehr vorhanden sind. Dentinkanälchen 5 ist in seinem Verlauf nicht vollkommen sicher zu beurteilen, biegt aber wohl am Rande des Interglobularraumes ab und verläuft ebenfalls in der bedeckenden dünnen Gewebsschicht, wie die schärferen Konturen des in den Interglobularraum projizierten Kanalstückes bei Oberflächenscharfstellung vermuten lassen. Kanälchen 2, 4 und 7 scheinen in engere Beziehungen mit dem Interglobularraum zu treten; darauf wird später noch einzugehen sein.

Lässt man das gleiche Präparat lufttrocknen (Abb. 7), dann sind die Dentinkanälchen und der Interglobularraum als schwarze Gebilde sichtbar. Der Interglobularraum verhält sich also genau so wie die luftgefüllten Dentinkanälchen, was die Vermutung erlaubt, dass ein echter Hohlraum vorliegt.

Auch an anderen, nicht luftgefüllten Schliffen können Interglobularräume beobachtet werden, die wie echte Hohlräume wirken (Abb. 8 und 9). Wie und wo finden sich nun diese Interglobularräume nach der Entkalkung und der metachromatischen Färbung wieder?

Betrachtet man die Übersichtsaufnahme (Abb. 10) des in den Abb. 4-7 gezeigten Präparates nach der Entkalkung und Färbung, dann ist sie zunächst recht unauffällig. Ausser wenigen halbmondartigen, mindergefärbten Gewebsbezirken sind keine Besonderheiten zu erkennen. Entsprechend seiner Lokalisation im verkalkten Präparat, wäre der Interglobularraum etwa an der markierten Stelle zu erwarten.

Tatsächlich zeichnen sich bei etwas stärkerer Vergrösserung (Abb. 11) die Umrisse des gesuchten Interglobularraumes in voller Ausdehnung innerhalb dieses halbmondartigen, wenig metachromatische Substanz enthaltenden Gewebsbezirkes ab. Er ist scharf begrenzt und seine Ränder sind, ähnlich denen der Dentinkanälchen, gefärbt. Alle im Schliff vorhandenen Dentinkanälchen lassen sich bei gleicher Vergrösserung wie in Abb. 5-7 wiederfinden (Abb. 12). Dabei ziehen nunmehr, wie zu erwarten, die oberhalb des Interglobularraumes verlaufenden Kanälchen 3, 5 und 6 scheinbar durch den Interglobularraum hindurch.

Die im Schliff mögliche Differenzierung ist nicht mehr mit Sicherheit durchführbar, obwohl auch jetzt beim Mikroskopieren mit entsprechenden Tubusstellungen geringe Unterschiede in der Konturenschärfe vorhanden sind.

Kanälchen 2 hat offenbar entgegen der Vermutung keine unmittelbaren Beziehungen zum Interglobularraum, wohl aber Dentinkanal 7, dessen Einmündung in den Interglobularraum einwandfrei verfolgt werden kann.

Vielleicht mündet auch Kanal 4 ein, aber hier ist der Nachweis nicht eindeutig.

Die Mehrzahl der in verkalkten Präparaten sichtbaren Interglobularräume des Dentins finden sich nach der Entkalkung im Bereich des Globulardentins, eingebettet

in diejenigen Anteile des Interglobulardentins, die durch weitgehendes Fehlen metachromatischer Substanzen ausgezeichnet sind.

Dies bedeutet aber nicht, dass jeder im Globulardentin mindergefärbte Gewebsbereich einem Interglobularraum im verkalkten Dentin entspricht.

Die Anzahl der bei üblicher Durchlichtmikroskopie im Schliff sichtbaren Interglobularräume (Abb. 13) kann wesentlich geringer sein als die Zahl der nach Entkalkung und Färbung auftretenden mindergefärbten Interglobulargebiete (Abb. 14).

Auf Grund der bisherigen Untersuchungsbefunde möchte man also annehmen, dass die im verkalkten Dentin sichtbaren Interglobularräume echte Hohlräume darstellen, die in ihren Umrissen als definierte morphologische Gebilde im entkalkten Dentin erfasst werden können.

Nicht jeder im Schnitt sichtbare, mindergefärbte Gewebsbezirk des Interglobulardentins enthält unbedingt einen im verkalkten Dentin sichtbaren Interglobularraum.

Direkte räumliche Beziehungen zwischen Dentinkanälen und Interglobularräumen können angenommen werden.

LITERATUR

SCHMIDT, H. 1959a. Feststellung von Strukturunterschieden im entkalkten Dentin bei Anwendung einer metachromatischen Färbung. 6. ORCA Kongress, 2.-5. July, Pavia.

SCHMIDT, H. 1959b. *Enzymatisch histotopochemische Untersuchungen an der organischen Zahnschmelze*. Med. Dissert., Halle.

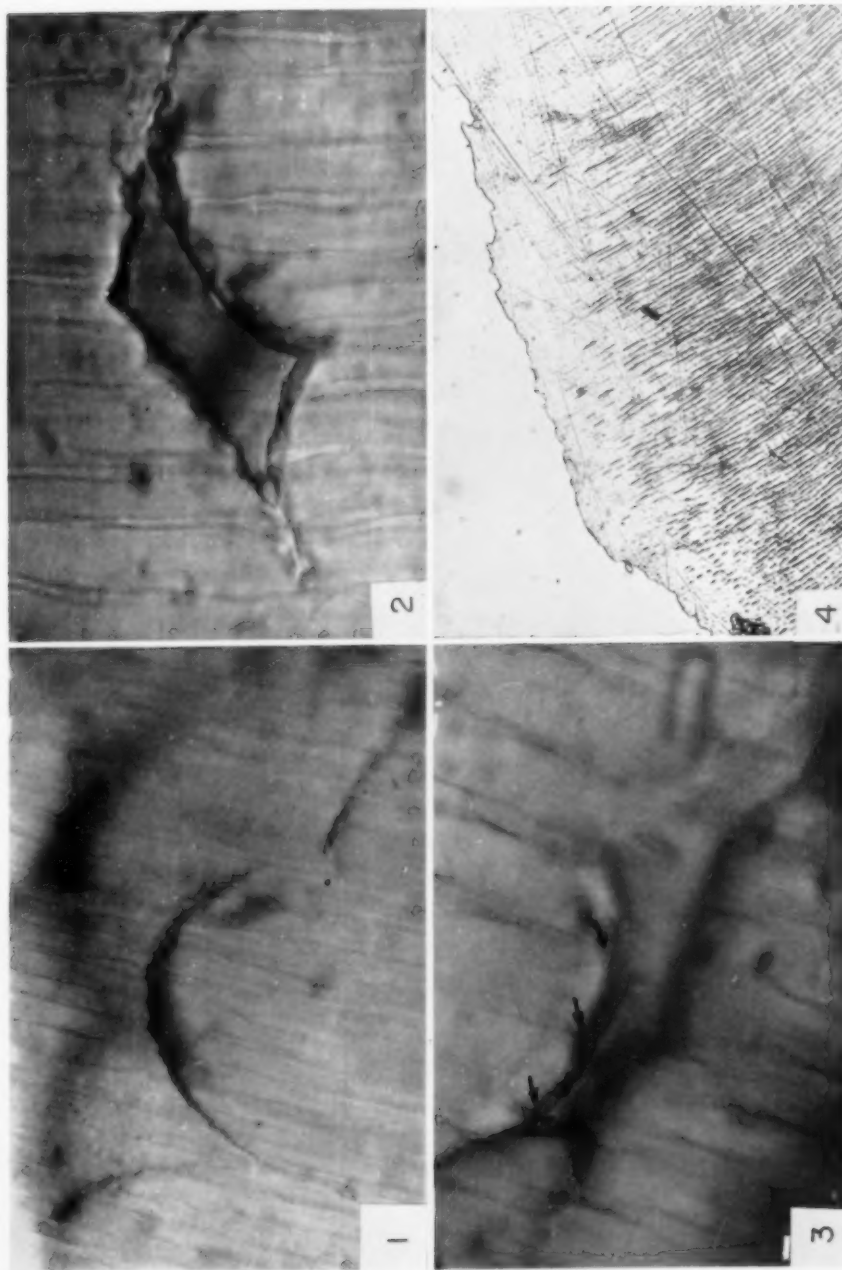


Abb. 1. Spaltförmiger Interglobularraum. Die dunkeln Stellen entsprechen tieferliegenden Interglobularräumen. $\times 1000$.

Abb. 2. Flächiger Interglobularraum mit weitgehend fehlender Kanälchenzeichnung innerhalb der Fläche. $\times 1000$.

Abb. 3. Am Rande eines Interglobularraumes abbiegende Dentinkanälchen. S. auch Abb. 8 und 9. $\times 1000$.

Abb. 4. Übersichtsaufnahme eines etwa 30μ dicken Schliffes, der nur einen einzigen mit Sicherheit diagnostizierbaren Interglobularraum aufweist. $\times 80$.

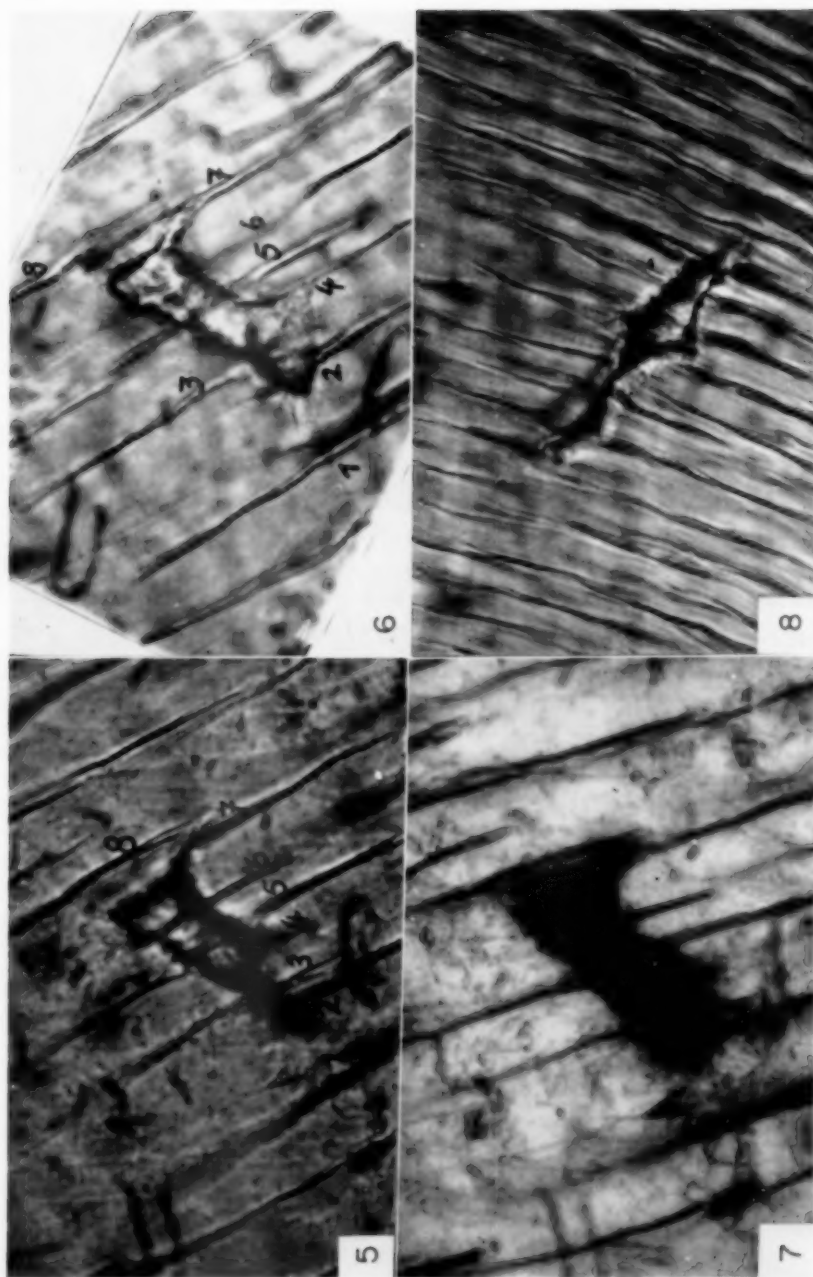


ABB. 5. Gleicher Interglobularraum wie in Abb. 4. Oberfläche scharf eingestellt. Erklärung im Text. $\times 1000$.
 ABB. 6. Gleicher Interglobularraum wie in Abb. 5. Die Aufnahme liegt etwa 0,003 mm tiefer. Weitere Erklärung im Text. $\times 1000$.
 ABB. 7. Gleicher Interglobularraum wie in den Abb. 5 und 6 nach Luftfüllung. $\times 1000$.
 ABB. 8. Interglobularraum, der wie ein echter Hohlraum wirkt. $\times 630$.

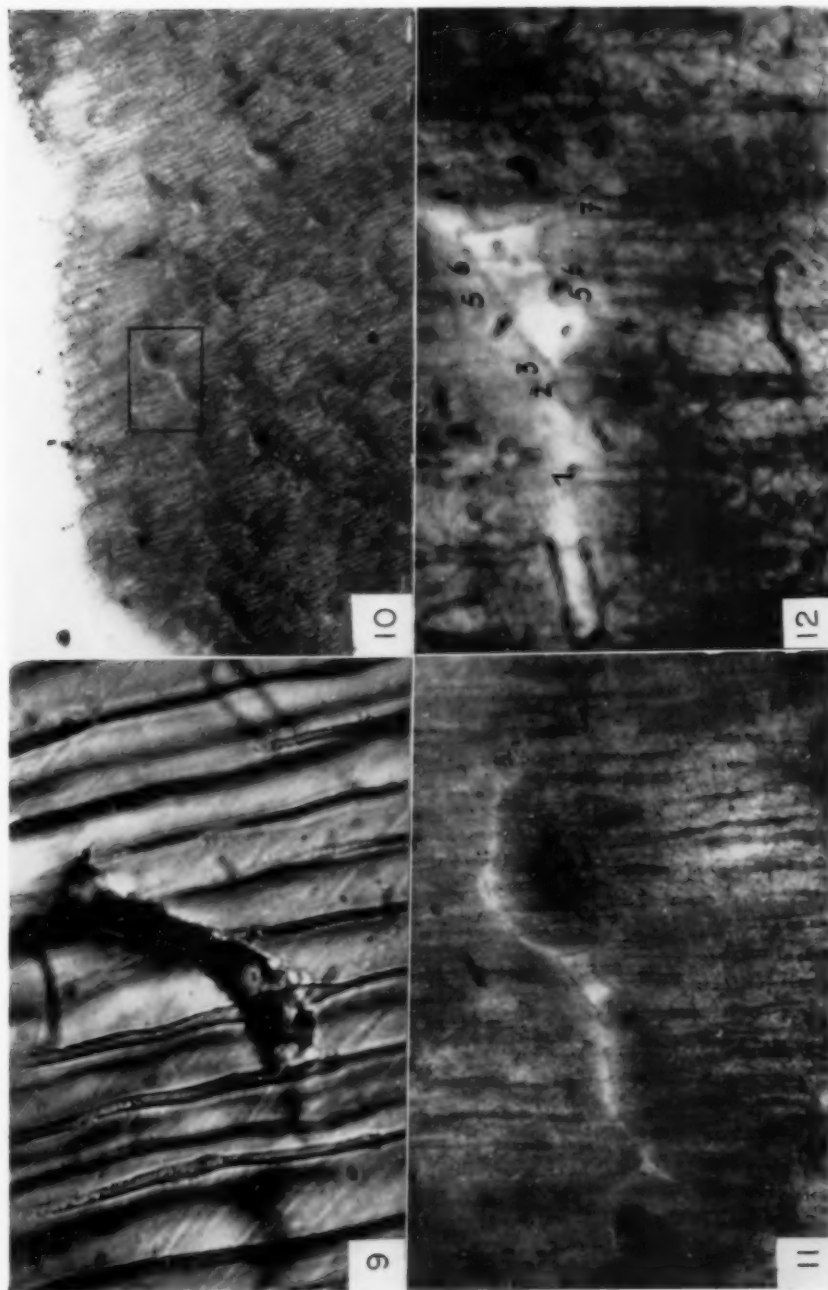


Abb. 9. Interglobularraum, der wie ein echter Hohlraum wirkt. $\times 1000$.

Abb. 10. Übersichtsaufnahme des in Abb. 4 gezeigten Präparates nach der Entkalkung. Innerhalb der markierten Stelle wäre der gesuchte Interglobularraum zu erwarten. $\times 80$.

Abb. 11. Die markierte Stelle der Abb. 10 bei stärkerer Vergrößerung. Die Umrisse des Interglobularraumes zeichnen sich deutlich ab. $\times 400$.

Abb. 12. Vergleichsbild zu Abb. 5, 6 und 7 nach der Entkalkung. Erklärung im Text. $\times 1000$.

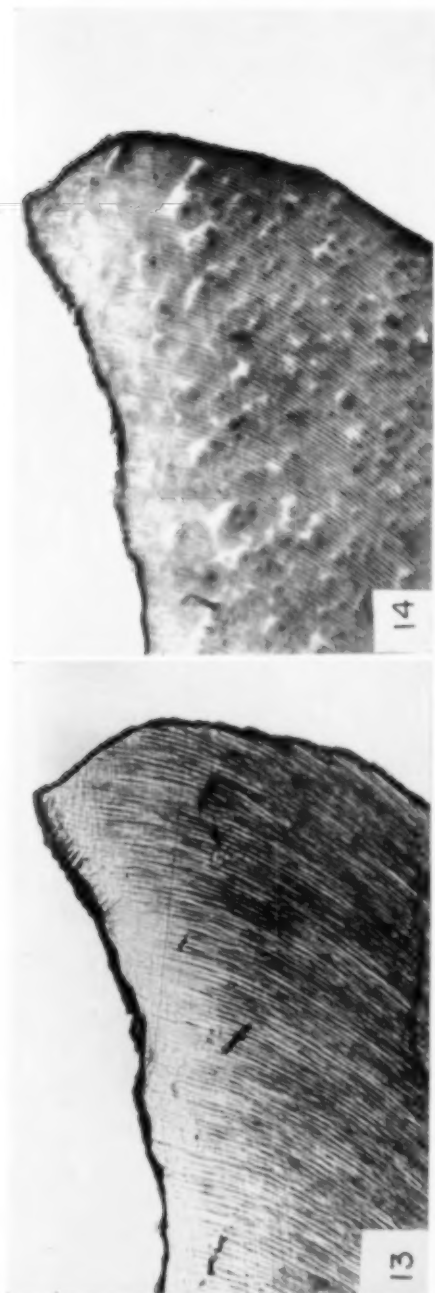


Abb. 13. Vor der Entkalkung sichtbare Interglobularräume. Weitere Erklärung im Text. $\times 80$.

Abb. 14. Vergleichsbild zu Abb. 13. Nach der Entkalkung sichtbare, keine metachromatische Substanz enthaltende Gewebsbezirke (weiße Flecke im Bild) im Globulardentin. $\times 80$.

THE HISTOLOGY OF FLUOROSSED TEETH

ANNA-GRETA GUSTAFSON

Department of Histopathology, Royal Dental School,
Malmö, Sweden

Abstract—Teeth from a high fluorine district were investigated by transmitted light, by polarized light, by dark-field illumination, by microradiography and by routine histology after decalcification.

Large areas of hypo-mineralization were found in the enamel, the prisms followed an irregular course and the arcade-shape of the dentino-enamel junction was accentuated and irregular.

Most of the dentine was of "normal" appearance. The course of the tubules and the degree of mineralization were both within "normal" limits.

The pulp chamber and pulp canals were of "normal" size. There were, however, a large number of fairly large denticles. Some were completely enveloped by dentine, others were merely attached to it while some lay quite free in the pulp tissue.

Résumé—Nous avons étudiés des coupes de dents fluorées (eau de boisson 4,2 pour mille) par la lumière transmise ordinaire, la lumière polarisée et la microradiographie.

La surface des dents est souvent très irrégulière, et ceci est leur apparence macroscopique. Pourtant la plupart des dents ont une surface lisse, ce qui prouve une haute minéralisation de la couche externe, alors que l'émail interne présente de larges zones d'hypominéralisation parsemant tout l'émail. Près de la jonction adamantodentinaire on trouve souvent une couche hypominéralisée séparée de la dentine par une bande étroite et bien minéralisée.

Ces variations dans la minéralisation peuvent être examinés en lumière polarisée et en microradiographie.

Ces recherches montrent aussi une orientation irrégulière des prismes. La limite émail dentine se présente souvent sous forme d'un feston plus prononcé que dans les dents témoin.

On n'a pas trouvé de changement dans la masse dentinaire ni en lumière polarisée ni en microradiographie. Pourtant on trouve de nombreux denticules dans la dentine soit attachés à celle-ci, soit libres dans la pulpe.

Zusammenfassung—Schliffe von fluorotischen Zähnen (4,2 p.p.m. im Trinkwasser) wurden im normalen durchfallenden Licht, im polarisierten Licht und mit Hilfe der Mikroradiographie untersucht.

Die Oberfläche des Schmelzes ist oft so uneben, dass es makroskopisch zu erkennen ist. Die meisten Zähne haben jedoch eine glatte Schmelzoberfläche mit einer stark mineralisierten äusseren Schicht, während im Vergleich hierzu die innere Schicht hypomineralisierte Bezirke zeigt, die über den ganzen Schmelz verteilt sind. An der Schmelz-Dentin-Grenze befindet sich oft eine hypomineralisierte Schicht, die vom Dentin durch eine schmale, gut mineralisierte Lage getrennt ist.

Die Variationen in der Mineralisation können sowohl im polarisierten Licht als auch in Mikroradiogrammen beobachtet werden. Diese Untersuchungen zeigen auch unregelmässige Richtungen der Prismen.

Die Schmelz-Dentin-Grenze stellt oft eine Arkadenform dar, die viel ausgeprägter ist als in der Kontrollgruppe.

Weder im polarisierten Licht noch in Mikroradiogrammen konnten Abweichungen in der Masse des Dentins gefunden werden. Es waren jedoch eine grosse Anzahl von wandständigen und frei in der Pulpa befindlichen Dentikeln festzustellen.

INTRODUCTION

MOST INVESTIGATIONS of the histology of fluorosed teeth have been concerned only with the enamel. Some degree of hypo-mineralization has always been observed although details have never been described accurately.

Very little attention has been paid to the other parts of the tooth, the dentine and the pulp.

This investigation was carried out to determine if there are other changes affecting the development of the tooth which can be attributed to the high content of fluorine in the drinking water.

MATERIAL AND METHODS

The material for this study comprised approximately 100 teeth from Isparta, a town in west Turkey where the domestic water supply contains about 4.2 p.p.m. of fluorine.

Ground sections were prepared and examined by transmitted light, polarized light, microradiography and in dark-field illumination. Nine teeth have been decalcified and stained with Hansen's haematoxylin and eosin. Before decalcification, microradiographs were taken of these teeth to show the width of the pulp and any changes which had taken place. The techniques have been described in detail in an earlier publication (GUSTAFSON, 1959).

The macroscopic appearance of teeth from this area has already been described by ATA (1955). He described how many of the teeth of the inhabitants of Isparta were discoloured and how the surface of the enamel is often uneven, furrowed and pitted.

Control groups of teeth were obtained from areas in Turkey with low contents of fluorine in the drinking water and from Malmö in Sweden where there is also a low content of fluorine in the domestic water supply.

Enamel

In some of the teeth the outer surface of the enamel was very uneven (Fig. 1, polarized light). In most teeth, however, the surface is smooth and devoid of any special characteristics.

In many teeth the prisms followed a very irregular course (Figs. 1 and 8, polarized light); this was sometimes associated with an uneven outer enamel surface but was also found in enamel with a smooth outer surface (Fig. 2, dark-field).

Examination in polarized light revealed considerable variations in the degree of mineralization of the enamel (Fig. 3, polarized light), with areas of pseudo-isotropic and positive birefringence. These areas of positive birefringence were basically similar in character to those in the corresponding areas of teeth from Malmö and other low-fluorine areas. The only difference lay in their number and extent.

As can be seen in Fig. 4 (polarized light), the Retzius lines were very prominent in the fluorosed enamel. A special type of hypo-mineralization was often found in the part of the enamel adjacent to the dentine (Fig. 5 (a), dark-field and Fig. 5 (b), microradiograph). This was separated from the dentine by a thin layer of more-highly mineralized enamel along the enamel-dentine junction.

THE HISTOLOGY OF FLUOROSED TEETH

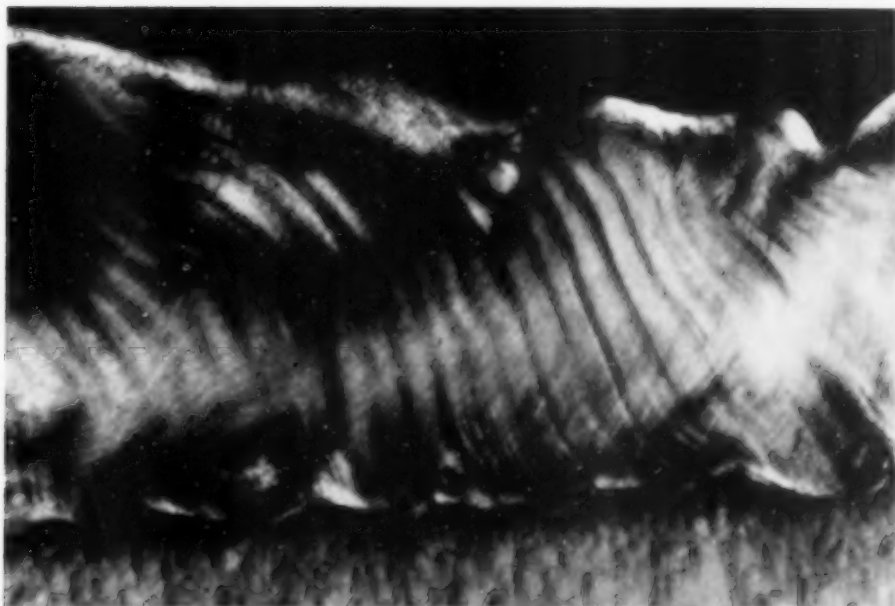


FIG. 1. $\times 200$.

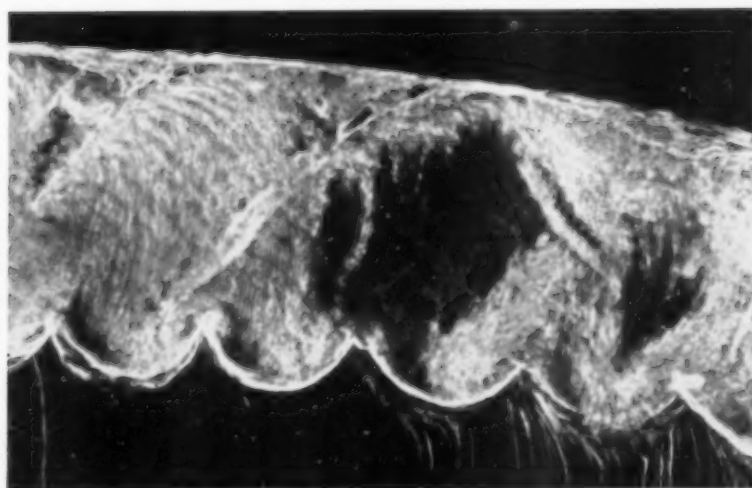


FIG. 2. $\times 65$.

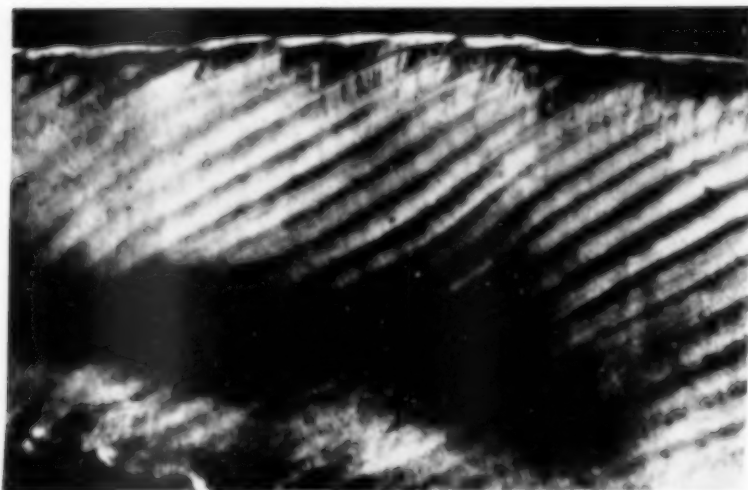


FIG. 3. $\times 180$.



FIG. 4. $\times 110$.

THE HISTOLOGY OF FLUOROSSED TEETH



FIG. 5 (a). $\times 65$.



Fig. 5 (b). $\times 90$.

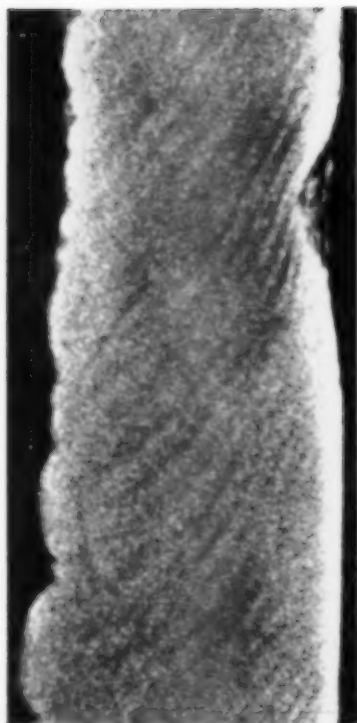


FIG. 6. $\times 65$.

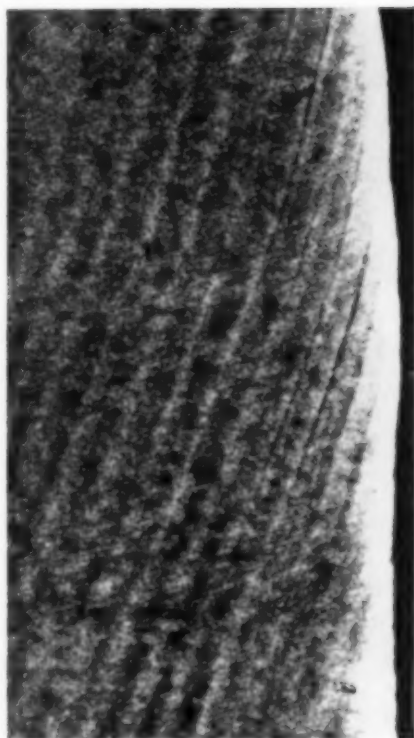


FIG. 7. $\times 175$.

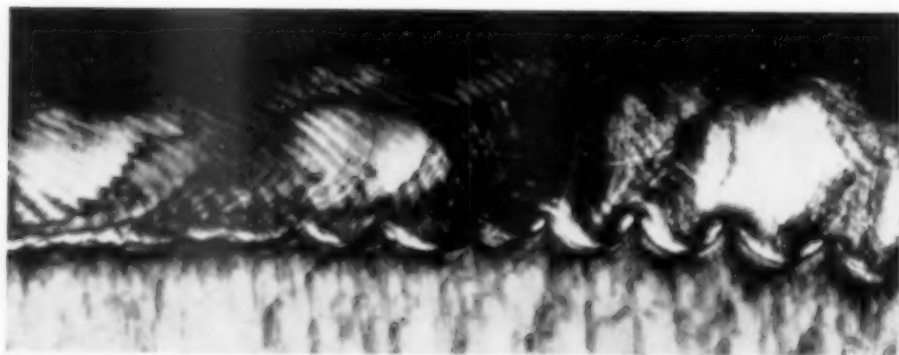


FIG. 8. $\times 110$.

These variations in mineralization were also seen clearly in microradiographs which showed the irregular areas (Fig. 6) and the Retzius lines (Fig. 7).

Although a statistical analysis of these results has not yet been carried out it was quite evident that there was a much higher incidence of areas of low mineralization in teeth from the high-fluorine districts than in the teeth from the low-fluorine districts.

Dentino-enamel junction

The junction between enamel and dentine is usually arcade-shaped. Its exact form varies from tooth to tooth and is, to some extent, characteristic of the individual. In fluorosed teeth, however, the arcade-shapes are much more pronounced (Fig. 2, dark-field illumination and Fig. 8, polarized light) than in "normal" teeth.

Dentine and pulp

No abnormal changes were observed in the dentine. Microradiographs showed the same pattern of mineralization as was found in the control group. The size of the pulp chamber was also within "normal" limits.

The only difference from the control group was in the number of denticles. These were very numerous in the fluorosed teeth, of thirty fluorosed teeth seventeen showed a great amount of denticles (up to nine), whereas of forty-five control teeth only two showed denticles (each two). The denticles were found embedded in the dentine, partly attached to it or lying free in the pulp tissue.

DISCUSSION

Most of the ground sections were examined both by microradiography and by polarized light. The results with these two methods corresponded very closely as will be shown in more detail in a coming paper (GUSTAFSON and GUSTAFSON).

This investigation has confirmed the generally-held belief that there are areas of hypo-mineralization in enamel of teeth from high-fluorine districts.

New observations of changes in the form of the enamel-dentine junction and of increased numbers of denticles were made. These must be due to the fluorine affecting the connective tissue in some way. The arcade-form of the dentino-enamel junction is, of course, only an exaggeration of the "normal", and may be due to an effect on the enamel epithelium or on the dental papilla.

REFERENCES

- ATA, P. 1955. Fluorose endémique et carie dentaire à Isparta (Turquie). *Rev. mens. Suisse d'Odontol.* **56**, 347-359.
- GUSTAFSON, A.-G. 1959. A morphologic investigation of certain variations in the structure and mineralization of human dental enamel. *Odont. Tidskr.* **67**, 361-472.

X-RAY DIFFRACTION STUDIES OF THE INSOLUBLE PROTEIN IN MATURE HUMAN ENAMEL

W. G. PERDOK and G. GUSTAFSON

Laboratory for Crystal Physics of the University, Melkweg 1, Groningen, Netherlands,
and Department of Histopathology, The Royal Dental School, Malmö, Sweden

Abstract—Tooth enamel protein was generally believed to be a keratin, but recent investigations on its amino acid content suggested some affinity with collagen. Up to now X-ray diffraction patterns of tooth enamel protein showing its nature could not be obtained because of the high content of inorganic matter in enamel and the fragility of the protein network after complete removal of the hydroxy-apatite. A special method of decalcification, however, made it possible to obtain X-ray diffraction fibre diagrams of the insoluble tooth enamel protein, showing that it does not belong to the collagen group of proteins. Rather does it belong to the keratin group, but it is definitely not in the completely extended form of the β -keratins. On the other hand it seems to be in a slightly more stretched form than the epithelial α -keratins, so that we prefer to call it δ -keratin, the structure of which and its connexion to the apatite crystal structure is the subject of further investigations. The correspondence between the repeat distances in tooth enamel protein and the main lattice translations of the apatite structure is striking.

Résumé—Les auteurs ont étudié le caractère de la protéine insoluble dans l'émail dentaire adulte au moyen des rayons X. Généralement on est d'avis que cette protéine soit du type des kératines—étant formée par l'action des cellules d'origine ectodermale, mais l'analyse chromatographique a montré, que la protéine de l'émail est différente des kératines épithéliales: sa teneur en cystine est inférieure et la présence de l'acide aminé hydroxyproline suggère une affinité avec la collagène. Jusqu'à présent il a été impossible d'obtenir des diagrammes de rayons X parce que l'émail contient au moins 96 pour cent de substance inorganique. D'autre part une décalcification complète ne laisse qu'une masse fibreuse protéique dont la structure régulière est détruite au moindre attouchement.

Cependant, au moyen d'une méthode spéciale de décalcification on a réussi d'obtenir des diagrammes de diffraction, permettant d'établir l'espèce de la protéine dans l'émail, qui n'est ni la collagène ni la β -kératine, mais plutôt du type de l' α -kératine. Toutefois les auteurs ont trouvé des indications que la chaîne polypeptidique est plus étendue que dans les kératines épithéliales et ils proposent le nom δ -kératine pour la kératine dentaire.

La correspondance entre les périodes dans la kératine dentaire et les translations principales du réseau cristallin de l'apatite explique la croissance orientée (épitaxie) des cristallites de l'apatite sur les fibres protéiques de la matrice organique dans l'émail.

Zusammenfassung—Ausgangspunkt der Untersuchung war die neulich wieder aufgeworfene Streitfrage ob das Protein des Zahnschmelzes keratinöser oder vielleicht kollagener Art sei. Chromatografische Analysen der Aminosäuren des Schmelzproteins, hatten ausgewiesen, dass es sich von Haar- und Hautkeratinen unterscheidet durch einen geringeren Gehalt an Cystin und die deutliche Anwesenheit des Hydroxyprolins, was auf eine Verwandtschaft mit Kollagen hinweisen könnte. Dergleichen Fragen lassen sich gut lösen mittels Röntgenstrahleninterferenzmethoden, die aber

bis jetzt scheiterten wegen des hohen Gehalts des Schmelzes an anorganischen Material (Apatit). Erschöpfende Dekalzifizierung des Schmelzes lässt ein äusserst delikates Netzwerk von Proteinfasern zurück, das bei der geringsten Berührung zusammenbricht. Dennoch gelang es durch eine spezielle Entkalkungsmethode gute Faserdiagramme aufzunehmen welche eine Entscheidung über die Natur des Schmelzproteins gestatten. Das Hauptresultat der Untersuchung ist die Feststellung, dass das unlösliche Schmelzprotein kein Kollagen ist, sondern vielmehr zu den Keratinen gehört. Da die Keratine sich in eine α - und eine β -Gruppe einteilen lassen, ist noch zu entscheiden zu welcher dieser beiden Gruppen das Schmelzprotein gehört. Die β -Keratingruppe kommt nicht in Frage wegen des Fehlens der 4.65 Å equatorialen Reflektion, sodass das Schmelzprotein vielmehr zu den nicht völlig ausgedehnten α -Keratinen gehören muss. Dennoch gibt es Anzeichen, dass das Schmelzprotein eine etwas mehr gestreckte Polypeptidkette als die Epithelkeratinen hat. Deshalb wird von den Autoren vorgeschlagen, das Schmelzprotein als δ -Keratin zu bezeichnen (δ von dental). Die Übereinstimmung der Perioden im Schmelzprotein mit den Haupttranslationen im Apatitgitter macht die orientierte Aufwachsen (Epitaxie) von den Apatitkristalliten auf den Proteinfasern der organischen Matrix verständlich.

INTRODUCTION

TOOTH ENAMEL is the hardest of all vertebrate tissues. It is considerably more densely calcified than bone, mature human enamel consisting for more than 96 per cent of orientated hydroxy-apatite crystallites embedded in an organic matrix. This matrix consists largely of protein, the weight of which—according to nitrogen analyses—must amount to roughly 0.5 per cent of the enamel. The enamel being produced by cells of ectodermal origin it was generally believed—as suggested by Hoppe already a century ago—that the organic matter must be of a keratinous nature, but recent investigations on enamel protein showed that there are at least two types, a soluble glycoprotein (STACK, 1954) and an insoluble protein, the latter differing from skin or hair keratins in having a lower cystine content and a notable percentage of hydroxyproline. As hydroxyproline is an amino acid characteristic for collagen this fact created some doubt as to the keratinous nature of the enamel protein. According to EASTOE (1960) "It is not surprising that the matrix protein should be unlike the keratins in composition since it is secreted by highly active ameloblasts, whereas the epithelial keratins result from cell degeneration".

The great importance of this organic matrix for the properties of enamel has been pointed out by one of us already (PERDOK, 1952). It was found then that fluoridized enamel does not show the lattice contraction connected with the transformation of hydroxy-apatite into fluor-apatite as long as the organic matrix is intact. This remarkable fact points to the conclusion that an intimate connexion must exist between the apatite crystal structure and the repeat of molecular building units in the enamel protein. Apart from that, only under these conditions is it plausible that a mass of very small apatite crystallites can be cemented together to such a rigid texture as tooth enamel shows.

At that time the author also suggested the possibility of epitaxial growth of the apatite crystallites on the protein fibres and emphasized the close agreement between the lattice parameters of apatite ($a=9.4$ Å, $c=6.9$ Å) and the mean repeat distances in β -keratin (equatorial reflection spacings 9.7 and 4.65 Å = $\frac{1}{2} \times 9.3$ Å and meridional

reflection spacing $3.33 \text{ \AA} = \frac{1}{3} \times 6.7 \text{ \AA}$). These views have been strongly supported by recent electron microscopic evidence obtained by R. FRANK, J. G. HELMCKE, H. LENZ and others and presented at this Congress, but up to now no X-ray diffraction patterns of tooth enamel protein could be produced, allowing its nature to be established by measuring repeat distances.

It is true that S. FEITELBERG and F. MEYER have communicated in a meeting of the American Crystallographic Association (Washington 1951) that tooth enamel protein gave the diffraction pattern of collagen, but no details have been published afterwards. This observation has probably been erroneous, as only dentine fibres give a collagen protein. There is another assertion by LITTLE (1959) that specimens of tooth enamel "prepared under conditions which would cause the less dense component to dissolve, give a β -keratin X-ray diffraction pattern", but even her latest publication (LITTLE, 1960) gives no photographs or further details of how the specimens were prepared.

PREPARING ENAMEL MATRIX FOR EXAMINATION BY X-RAY DIFFRACTION

As the amount of organic material in human tooth enamel is very small in relation to the amount of inorganic material, the chances of obtaining clear diffraction patterns are greater the more the specimen is demineralized. Demineralized enamel matrix is, however, very fragile and difficult to handle unless embedded in some supporting substance; but embedding materials cannot be used for X-ray diffraction. If, on the other hand, attempts are made to fix the unembedded demineralized matrix to a holder or in a capillary tube, as is usual in X-ray diffraction investigation, it will almost certainly be destroyed and all orientation will be lost.

A method was therefore necessary which would permit the demineralization of the matrix without its destruction or disorientation and without embedding. Such a method will now be described.

As the X-ray diffraction beam is very narrow, it was thought that only the actual area being examined need be demineralized, leaving the surrounding enamel in its original state.

To do this, two holders were made of a transparent plastic material (Fig. 1). A hole, 0.5 mm in diameter, was drilled in the centre of each holder and both could be fitted into a tube so that these holes were exactly in line.

A ground section of a tooth was then placed with the area of enamel, which was to be investigated, over the hole in one holder. The section was 0.25 mm thick and planoparallel and was fixed to the holder with water-resistant glue. When this glue had set, the holder and its attached section were placed in the tube and the second holder coated with glue was then inserted into the tube and pressed firmly down onto the other side of the section. When this glue had set, the holders were taken out of the tube and the excess glue removed by a drill the size of the holes. Thus, the section was completely sealed except for the area exposed by the holes which could be reached by decalcifying fluids. In this way the amount of enamel which was de-

mineralized was kept to an absolute minimum and the demineralized matrix supported by the surrounding intact enamel.

Demineralization can be carried out with any suitable liquid. In this investigation EDTA and formic acid were used. In order to fix the matrix, demineralization was interrupted every 24 hr and the holders and specimen immersed in neutral formalin for 24 hr. This alternating routine was continued until radiographic examination showed that demineralization was complete.

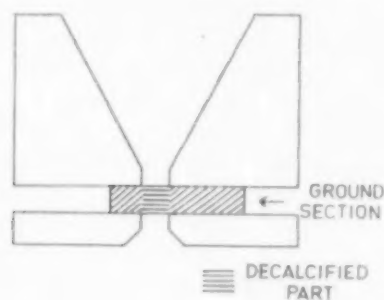


FIG. 1

As the section is never removed from the holders in this method, the organic matrix is well preserved; even when sent by post from Sweden to Holland immersed in a rubber vessel filled with neutral formalin. Certainly the teeth used in this study were from a district in Turkey with a water supply containing 4 p.p.m. of fluorine so that they were more resistant to damage than "normal" teeth.

DISCUSSION OF THE DIFFRACTION PATTERN OF TOOTH ENAMEL PROTEIN

The photographs reproduced in Figs. 2 and 3 have been obtained in a flat plate camera with cobalt radiation (specimen-film distance 50 mm) using different preparations. Many details have been lost in the reproduction process.

The tooth enamel photographs are definitely fibre patterns—like those of wool, tendon, cotton fibre, etc.—in agreement with the fibrillar texture of tooth enamel observed in the microscope even at low magnifications. Fig. 2 shows a weak reflection besides the equatorial main spot, indicating that a secondary bundle of fibres must be present, making an angle of somewhat less than 30° with the main direction.

The most prominent reflection of the tooth enamel protein pattern is the large equatorial diffuse spot indicating an average repeat distance between the protein chains of 9.5 Å, almost equal to the lattice constant of hydroxy-apatite in the direction of the a -axis. Consequently the OH- and PO₄-groups in hydroxy-apatite, when looking down along the c -axis, show exactly the same pattern as a cross-section through the protein chains. The same distance is found in α - and β -keratin, while in collagen this is notably larger, viz. 12 Å. The diffraction pattern of β -keratin, however, is characterized by an additional strong equatorial reflection of 4.65 Å spacing which is definitely missing on the enamel protein pattern. No more do we find here the diffuse equatorial spot of 4.5 Å spacing which is common on collagen diffraction photographs, so that the enamel protein is not of the collagen- or β -keratin-type.

A further consideration of the meridional reflections points to the same conclusion: neither the 3.33 Å β -keratin reflection nor the 4 Å and 2.86 Å collagen reflections can be observed on our patterns. Consequently tooth enamel insoluble protein is likely to belong to the α -keratin group (wool, hair, etc.) but the characteristically strong meridional arc of 5.15 Å spacing found on α -keratin patterns is not observed on our photographs: only a weak and broad reflection of 5.5 Å spacing appears on long exposure films. This could be an indication that the chain in tooth enamel protein is stretched to a greater extent than the epithelial keratins, as its repeat distance nearly equals the 5.4 Å pitch of Pauling and Corey's α -helix.

The meridional reflections on the tooth enamel protein patterns indicate chain repeat distances of 20 Å and roughly 7 Å (very diffuse spot) these spacings being close to resp. 3x and 1x the lattice parameter c of hydroxy-apatite (6.9 Å). The diffraction patterns of partly decalcified enamel show clearly that the crystallites are orientated with their c -axes parallel to the protein chains, in agreement with microscopical evidence. The epitaxial relations between the apatite crystallites and the organic matrix can be readily understood from the similarity of the periodic sequence of OH- and PO₄-groups in the apatite lattice and of the repeat of active groups (CO, NH, OH) in the protein fabric.

As the pattern of tooth enamel protein lacks some characteristic reflections of α - as well as of β -keratin, the authors prefer to call the dental keratin: δ -keratin of which the structure and its connexions to the crystal structure of apatite is the subject of further investigations.

Work is in progress on preparations with different decalcifying agents and with animal teeth, where perhaps may be found a similar protein in a more perfect state of crystallization, so that more detailed diffraction patterns will be obtained.

Acknowledgement—The authors wish to acknowledge the assistance of Mr. K. YNTEMA in making and measuring the X-ray photographs.

X-RAY DIFFRACTION STUDIES OF THE INSOLUBLE PROTEIN IN MATURE HUMAN ENAMEL

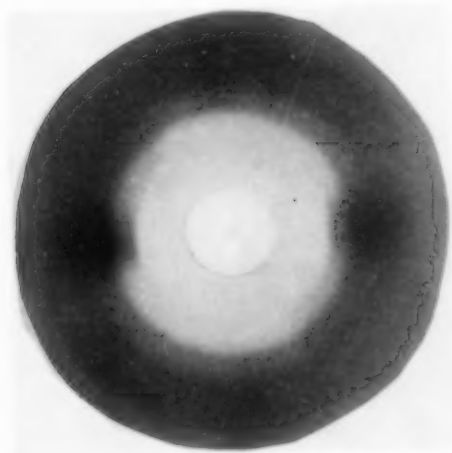


FIG. 2

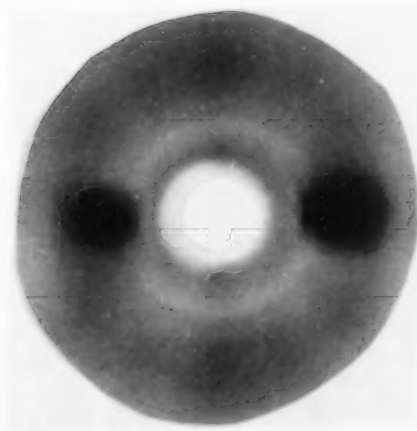


FIG. 3

Vol.
4
1961

REFERENCES

- EASTOE, J. E. 1960. Organic matrix of tooth enamel. *Nature, Lond.* **187**, 411-412.
- LITTLE, K. 1959. Electron microscope studies of human dental enamel. *J.R. micr. Soc.* **78**, 58-66.
- LITTLE, K. 1960. The application of some scientific methods to dental research. *Brit. dent. J.* **109**, 11-21.
- PERDOK, W. G. 1952. Die Aufnahme von Fluorionen durch Zahnschmelz. *Schweiz. Mschr. Zahnheilk.* **62**, 249-267.
- STACK, M. 1954. Organic constituents of enamel. *J. Amer. dent. Ass.* **48**, 297-306.

HÄRTEMESSUNGEN AM NORMALEN UND ERKRANKTEN ZAHNHARTGEWEBE

M. HERRMANN

Karies-Forschungsinstitut der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz, Deutschland

Zusammenfassung—Am normalen und erkrankten Zahn des Menschen und der Ratten wurden Härtemessungen am Schmelz und Dentin mit dem "Durimet"-Mikrohärteprüfer durchgeführt.

Die Härtemessungen am Schmelz und Dentin sind zwar zeitraubend und sehr mühevoll und verlangen auf Grund ihrer komplizierten Methodik eine gewisse Einarbeitungszeit. Diese Messmethode mit dem Durimet ergibt jedoch auf Grund der exakten Aussagen die Möglichkeit, die am Menschen mit Hilfe anderer Untersuchungsmethoden erhobenen Befunde oder die im Tierexperiment erzielten Ergebnisse nachzuprüfen.

Abstract—Hardness measurements of enamel and dentine in normal and diseased teeth were carried out with the "Durimet" micro-hardness tester.

Hardness measurements on enamel and dentine are very time-consuming and laborious and the complicated methods require a certain amount of experience. This method of measurement with the Durimet, because of its exact readings, does, however, make it possible to confirm results obtained with other methods of investigation or in animal experiments.

Résumé—Nous avons effectué ces mesures à l'aide de l'appareil de mesure de microdureté "Durimet" sur la dentine et l'émail de dents humaines et de rats.

Ces mensurations prennent du temps et sont difficiles et exigent du fait de la technique compliquée une certaine préparation. Etant donné l'exactitude des chiffres donnés par le Durimet on peut contrôler ceux obtenus par d'autres méthodes tant sur l'animal que sur l'homme.

HÄRTEBESTIMMUNGEN an Zähnen wurden verschiedentlich durch die Ritzmethode (Moss), die Kugeleindruckmethode (Brinell) und die Diamantpyramideneindruckmethode (Vickers) durchgeführt. Die Messung nach Vickers mit dem von der Firma Leitz, Wetzlar, konstruierten Kleinhärteprüfer "Durimet" übertrifft an Genauigkeit alle anderen Messverfahren am Schmelz oder Dentin, denn die Tiefe des Pyramideneindrucks kann sehr exakt berechnet und die Entfernung einer Messstelle zur anderen kann mikroskopisch genau festgelegt werden. Der durch die Pyramide erzeugte Eindruck bei 15 g bis 500 g Belastung kann auf der polierten Schmelz- oder Dentinfläche bei 400-facher Vergrößerung sehr gut ausgemessen werden, eine Tabelle gibt dann auf Grund der Länge der Eindruckdiagonalen die Vickershärte in Einheiten (20-1300) an.

Mit Hilfe dieses Härteprüfers Durimet wurden von uns Härteprüfungen am Schmelz und Dentin der normalen und erkrankten Zahnhartsubstanz vorgenommen. Die einzelnen Ergebnisse sollen im folgenden dargelegt werden.

An 60 gesunden Zähnen, die von 30–60 Jahre alten Patienten stammten, wurden genau festgelegte Stellen der polierten Schmelzkrone der Härtemessung unterzogen. Diese Messpunkte lagen am Zahnhals und in der Mitte der Schmelzkrone und an der Zahnschneide und zwar sowohl bukkal bzw. labial als auch palatinal. Während am Zahnhals 2 Messpunkte und zwar einer am äussersten Schmelzmantel, der andere in nächster Nähe der Schmelz-Dentin-Grenze gewählt wurden, konnten in der Mitte der Schmelzkrone je 3 Messpunkte festgelegt werden, so dass im ganzen an jeder Schmelzkrone 13–19 Messpunkte erfasst wurden. Die Gesamtzahl der einzelnen Härtemessungen mithin $60 \times 20 = 1200$.

Die Messergebnisse sind sehr interessant, finden sich doch immer wiederkehrende und gleichbleibende Härteunterschiede an den topographisch verschiedenen Messpunkten. So sehen wir an der Kaufläche bzw. Schneide der Schmelzkrone einen statistisch gesicherten Härteunterschied der äusseren Schmelzmantelzone und der Schmelzdingengrenzzone und zwar sowohl an der bukkalen als auch an der palatinalen Schmelzkrone. Derselbe Unterschied findet sich zwischen dem Schmelz der Mitte der Schmelzkrone und dem Schmelz der Schmelzdingengrenzzone. Kein Unterschied besteht in der Härte der Mantelzone der Schmelzkrone verglichen mit der Mittelzone der Schmelzkrone und zwar auf der palatinalen Kronenseite.

In der Zahnmitte der Schmelzkrone liegen folgende Verhältnisse vor: Ein statistisch sicherer Unterschied besteht zwischen der Härte des äusseren Schmelzmantels und der Schmelzdingengrenzzone und zwar sowohl bukkal als auch palatinal. Ein statistisch auffälliger bis sicherer Unterschied besteht zwischen äusserem Schmelzmantel und der Mittelzone bzw. der Mittelzone und der Schmelzdingengrenzzone auf der bukkalen Seite.

Am Zahnhals der Schmelzkrone findet sich ein statistisch auffälliger bis sicherer Härteunterschied zwischen der äusseren Schmelzmantelzone und der Schmelzdentin-grenzzone der bukkalen sowie der palatinalen Schmelzkrone.

Zur Dentinhärtemessung wurden an 49 gesunden Zähnen Härtemessungen durchgeführt, wobei an jedem Zahn durchschnittlich 60 Härtemessungen vorgenommen wurden, so dass die Gesamtzahl der Messungen rund 3000 betrug. An folgenden Stellen des Dentins wurden Messungen durchgeführt:

- (1) Härteuntersuchung der Wurzelkanalwand durch fortlaufende Messungen von der Wurzelspitze bis zum Dach der Pulpenkammer in jeweils 50μ Abstand.
 - (2) Härteuntersuchung der Wurzelkanalzone
 - (a) an der Pulpenkammer, (b) am Wurzelkanaleingang,
 - (c) in der Mitte des Wurzelkanals, (d) an der Wurzelspitze
- (Als Wurzelkanalzone wird das Dentin beiderseits des Wurzelkanals in jeweils 600μ Breite bezeichnet).

Deutliche Unterschiede in der Härte des Dentins bestehen bei den verschiedenen Altersklassen. Bis zum 40. Lebensjahr steigt die Härte der Wurzelkanalzone allmählich an, um dann bis zum 60. Lebensjahr erst langsam, dann schneller abzu-

sinken. Die Härte des Dentins ist in unmittelbarer Nähe der Pulpa am geringsten, am Wurzelkanaleingang und in der Wurzelmitte findet sich eine grössere Härte als in der Nähe der Wurzelspitze. Als Erklärung für die geringere Härte des Wurzelkanalzonendentins kann die Tatsache herangezogen werden, dass das Ersatzdentin (Wurzelkanalzone) sich mit zunehmenden Lebensjahren verstärkt anbildet.

Zur Härteuntersuchung des Schmelzes und Dentins kranker Zähne musste notwendigerweise das Tierexperiment herangezogen werden.

Bei 20 Ratten wurde durch Thiouracil die Schilddrüsenfunktion gehemmt, während sie bei 20 Ratten durch Verfütterung getrockneter Schilddrüsensubstanz angefacht wurde. Die Zähne wurden auf ihre Härte geprüft und zwar wurden 3 Messpunkte im Schmelz und 5 Messpunkte im Dentin gewählt, die Mittelwerte der Messungsergebnisse zeigen einen statistisch sicheren bis auffälligen Unterschied zwischen der Härte des Schmelzes und des Dentins bei den gesunden Kontrolltieren und denen, deren Schilddrüse infolge der Thiouracil-Medikation oder Schilddrüsensubstanzfütterung eine Unterfunktion oder Überfunktion zeigten.

Härtemessungen am Zahn bei experimentell erzeugter Rachitis

Bei 2 Rattengruppen (Gruppe II und Gruppe III) wurde durch Verfütterung der McCollum-Kost Rachitis erzeugt und zwar bei Gruppe II im Alter von 23 Tagen, also kurz nach Beendigung der Laktation, bei Gruppe III "prænatal". Bei dieser prænatalen Rachitiserzeugung erhielten die Muttertiere in dem Augenblick ihre McCollum-Kost, in dem feststand, dass sie trächtig waren. Schon nach 23 Tagen zeigt die Röntgenkontrolle, dass die Tiere der Gruppe III von stärkerer Rachitis befallen waren als die der Gruppe II.

Als die Tiere an Gewicht nicht mehr zunahmen oder an Gewicht verloren, wurden sie getötet, ihre Zähne wurden der Härtemessung zugeführt.

Die Ergebnisse der Härtemessung des Schmelzes und des Dentins sind: Minderung der Härte bei beiden Zahnhartsubstanzen.

Aus der Pathologie des menschlichen Zahnes wissen wir, dass der rachitische Zahn mit seinen Schmelzhypoplasien sehr leicht der Karies anheimfällt und zerstört wird. Die Tierexperimente bestätigen, dass die Zahnstruktur infolge von Mineralisationsstörungen bei der Rachitis minderwertig wird, was durch Härtemessungen objektiv feststellbar ist. Die Behauptung mancher zahnärztlicher Praktiker, man könnte im rachitisch geschädigten Gebiss durch Bohren feststellen, dass gerade hier am rachitischen Zahn ausserhalb der rachitischen Hypoplasien eine besondere Härte der Zahnschubstanz vorzufinden sei, erscheint aus der Luft gegriffen.

Härtemessung am Zahn nach toxischen Fluorgaben

Die Härteprüfung wurde an den oberen Nagezähnen und den oberen ersten Molaren durchgeführt. Am Nagezahn wurde an 10 bestimmten Stellen gemessen und zwar an 3 Schmelzpunkten und 7 Dentinpunkten. Der 1. Molar wurde an 8 bestimmten Stellen geprüft, davon 4 im Schmelz und 4 im Dentin befindlich. Es waren also bei den 88 Tieren, die im Versuch standen, im ganzen 1584 Härtemessungen mit dem Durimet notwendig.

Die Verfütterung von 500 p.p.m. und 1000 p.p.m. NaF bewirkte an den Nagezähnen eine Veränderung der Farbe und Verlust der normalen Transparenz, ferner Schmelzdefekte und mottled enamel, akzessives Wachstum und anomal starke Abrasion. An den Molaren waren keine makroskopischen Veränderungen zu beobachten. Im grossen ganzen zeigt die toxische Fluormedikation bei den Versuchstieren eine Abnahme der Härte von Schmelz und Dentin.

THE STRUCTURE OF THE ENAMEL REVEALED IN DENTAL DISEASE

A. I. DARLING

Dental School, University of Bristol, Bristol, England

Abstract—Investigations of the dark zone of the carious lesion show that while it behaves as a Wiener mixed body in watery media, in non-watery media it acts as a molecular sieve imbibing only those media whose molecules are smaller than the spaces within the enamel in this zone. Air, water and methyl alcohol all appear to have molecules smaller than the size of the spaces. The body of the lesion appears to behave as a Wiener mixed body in all media. The details of the translucent zone have not yet been worked out, but the translucent zone produced by cold ethylene-diamine behaves as a Wiener mixed body in all media. This implies the presence of spaces much larger than those found in the dark zone, and suggests that the nature of the attack in the translucent zone is different from that in the dark zone.

Résumé—La zone sombre de la lésion initiale de la carie montre une biréfringence excessive et inhabituelle dans presque tous les milieux hydrophobes. Elle n'est pas due à la deshydratation, comme on le prétendait auparavant, puisqu'elle est absente dans l'alcool méthylique.

Lorsqu'on examine des sections séchées à l'air et ensuite imbibées dans des milieux de tailles moléculaires variables, on a pu montrer que la biréfringence de forme varie avec la taille des molécules des différents milieux. Ainsi donc la zone sombre agit comme un filtre moléculaire consistant en un grand nombre de petits espaces de dimensions variables. Les petits espaces non imbibés par les grosses molécules sont remplis d'air et provoquent cette biréfringence de forme inhabituelle.

L'émail normal montre un effet comparable quoique à un degré moindre.

La zone translucide de la carie "naturelle" ne contient probablement que de grands espaces accessibles à presque tous les milieux.

La zone translucide produite par l'éviction de la matrice soluble par l'éthylène diamine froide ne montre que de grands espaces accessibles à tous les milieux utilisés.

La différence de taille des espaces dans la zone translucide et la zone sombre permet de suggérer qu'elles sont produites par différents moyens, comme cela a été suggéré plutôt.

Zusammenfassung—Die dunkle Zone einer beginnenden Karies zeigt eine ungewöhnlich und stark ausgeprägte Doppelbrechung in fast allen hydrophoben Medien. Dieses ist nicht, wie früher angenommen, auf eine Entwässerung zurückzuführen, denn in Methylalkohol ist sie nicht vorhanden.

Bei einer Betrachtung von Schnitten, die zuerst in Luft getrocknet und dann mit Medien von unterschiedlicher Molekulargröße imbibiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Doppelbrechung in der dunklen Zone sich mit der Molekülgröße des zur Imbibierung benutzten Mediums ändert. Die dunkle Zone wirkt daher als Molekülsieb, das aus einer grossen Anzahl schmaler Spalten verschiedener Größe besteht. Die kleineren Spalten, die nicht mit grösseren Molekülen imbibiert werden, bleiben luftgefüllt und erzeugen die ungewöhnliche Doppelbrechung.

Gesunder Schmelz zeigt einen ähnlichen Effekt viel geringeren Grades.

Transluzente Zonen bei "natürlicher" Karies enthalten wahrscheinlich nur breite Spalten, die von feuchten Medien durchdrungen werden können.

Transluzente Zonen, die durch Entfernung der löslichen Matrix mit Hilfe von kaltem Äthylen-Diamin erzeugt wurden, zeigen nur breite Spalten, die von allen benutzten Medien passiert werden können.

Die festgestellten Unterschiede in der Grösse der Spalten zwischen den transluzenten und dunklen Zonen stützen die Auffassung, dass diese, wie früher vermutet, auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sind.

IN PREVIOUS PAPERS and communications the author has described the unusual behaviour of the dark zone of the early lesion of enamel caries in hydrophilic and hydrophobic media. It has been established that the body of the lesion behaves as a Wiener mixed body consisting of crystallites, and spaces which produce more or less form birefringence according to the refractive index of the medium by which they are imbibed (Fig. 1). The same behaviour can be found in the dark zone of

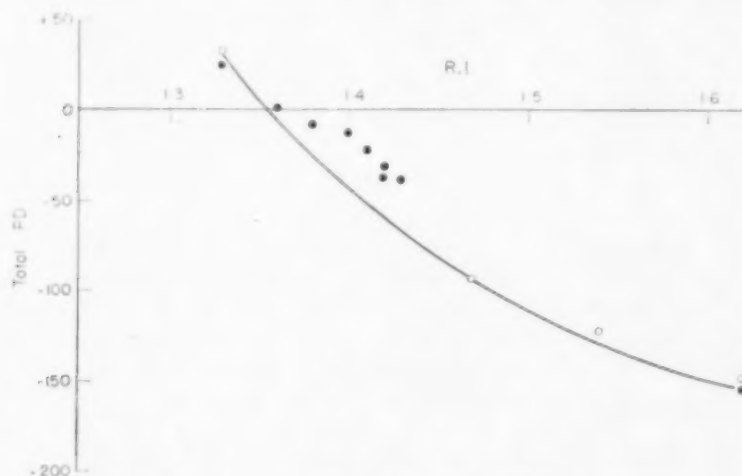


FIG. 1. Total P.D. related to R.I. 82/56 Body of lesion. ○, watery media; ●, non-watery media.

the lesion when it is imbibed with watery media of different refractive indices (Fig. 2), but as previously shown, an excessive and unusual form birefringence occurs in this zone in hydrophobic media. This form birefringence appears to be unrelated to the refractive index of the medium with which the specimen is imbibed (Fig. 2), and it was argued that the effect was probably caused by dehydration of the specimen. This appears to be manifestly untrue when it is remembered that in a previous paper DARLING (1958) noted that the behaviour of the lesion in methyl alcohol was precisely similar to its behaviour in water. Both media have similar refractive indices (about 1.33) and methyl alcohol is a potent dehydrating agent. It is therefore necessary to seek another explanation for the unusual form birefringence in the dark zone.

The existence of similar spaces in organic crystals came to our notice in discussions between colleagues in the departments of Dental Surgery and Chemistry, and it was suggested that the effects might be due to the minute size of the spaces admitting

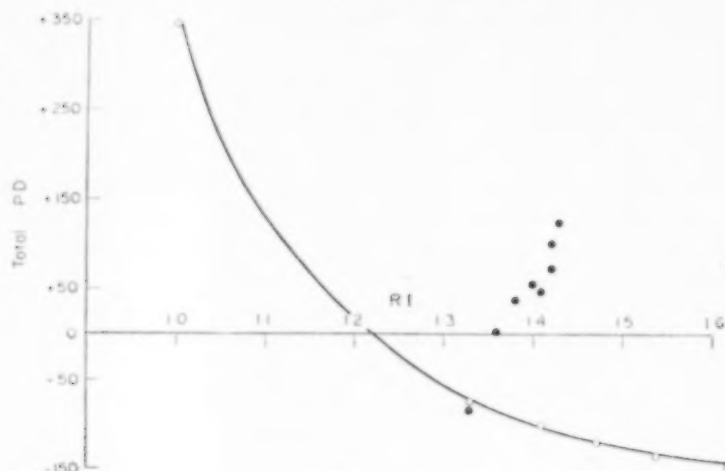


FIG. 2. Total P.D. related to R.I. 82/56 Dark Zone. \circ , watery media and air; \bullet , non-watery media.

some molecules and excluding others. A brief survey of the existing results strongly supported this suggestion, and investigations were made with ethyl alcohol and other media of various molecular sizes ranging from air on the one hand to octanol on the other hand. By this means it was shown that the form birefringence in the dark zone was greatest in media of large molecular size and fell in proportion to the reduction in size of the molecules in other media (Fig. 3). Thus air, water and methyl alcohol, all of which have relatively small molecules, can enter all the spaces so that the dark zone behaves as a Wiener mixed body in such media. With larger molecules, fewer and fewer spaces are imbibed with the actual fluid.

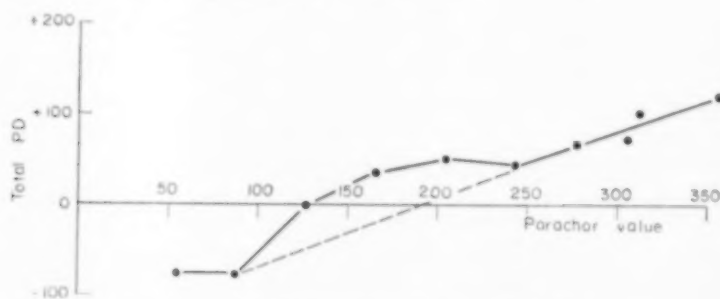


FIG. 3. Total P.D. related to molecular size. 82/56 Dark zone.

If one begins with a specimen dried after ethyl alcohol and imbibes the spaces first with media of large molecular size, e.g. octanol, and then with media of progressively smaller molecular size, then the form birefringence produced by the air in the spaces is actually reduced as the air is replaced by the media. The process is

slow and requires several hours' imbibition in each medium. If one transfers from methyl to ethyl alcohol, little if any change is caused because there is no affinity between the media, but if one changes from water to ethyl alcohol, the water is drawn out of those spaces which are too small to admit the molecules of ethyl alcohol (Fig. 4). Thus with media of ascending molecular size the phenomenon is not produced unless there is an affinity between the media. Where the form birefringence is produced by this means, the spaces cannot contain air, and one can only presume that they contain a residue of vapour of the previous medium. By this means it can

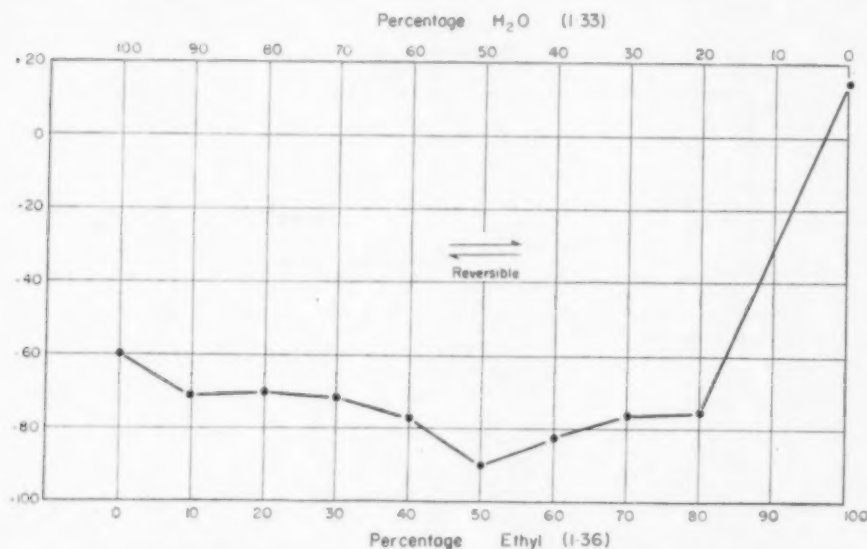


FIG. 4(a). 82/56 Dark zone. Total P.D. in mixtures of H₂O and ethyl alcohol.

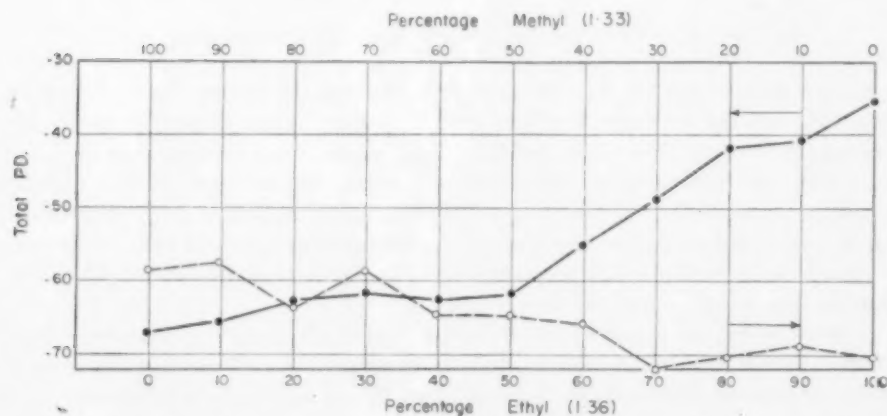


FIG. 4(b). 82/56 Dark zone. Total P.D. in mixtures of methyl and ethyl alcohol.

be shown that the dark zone contains approximately 2-4 per cent of spaces of varying size, many of which are accessible only to the molecules of air, water and methyl alcohol, together with small amounts of spaces which are accessible to molecules of various larger sizes, and an appreciable amount which are accessible even to octanol.

With these findings in mind it was decided to examine normal enamel and the translucent zone in the same way, and it has been shown that normal enamel contains approximately 0.1 per cent of spaces which are accessible only to air, water and methyl alcohol and not to any of the larger molecules (Fig. 5). These spaces appear to be distributed in the so-called structural markings of the enamel, i.e. interprismatic

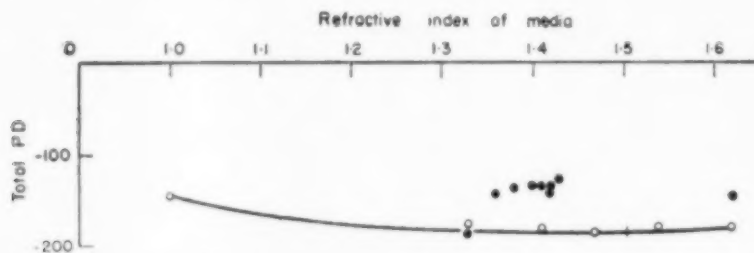


FIG. 5(a). Total P.D. related to R.I. 82/56 Normal enamel. ○, watery media and air; ●, non-watery media.

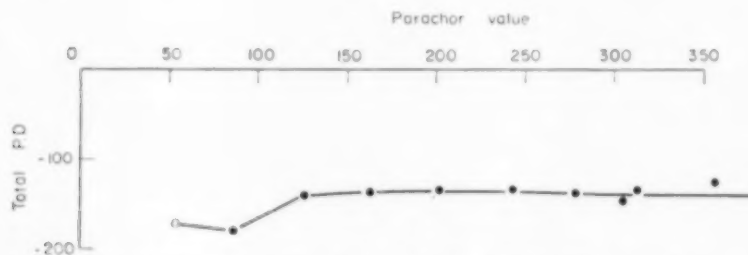


FIG. 5(b). Total P.D. related to molecular size. 82/56 Normal enamel.

substance, cross-striations, etc. Presumably in the striae of Retzius the same pattern exists, though the amount of spaces may be larger. Thus in watery media the structure of the enamel is very difficult to differentiate, while in quinoline, which has a relatively large molecular size, these spaces are filled with air and the structure is easily distinguished. The investigation of the translucent zone is not yet complete, but it seems probable that the translucent zone contains approximately 1 per cent of spaces, all of which are large enough to admit quite large molecules. In fact, it behaves very much as a Wiener mixed body.

Similar investigations on enamel treated with cold ethylene diamine to remove the soluble organic material appear to show the same pattern of large spaces similar to those expected in the translucent zone (Fig. 6). If as suggested, the translucent zone contains large spaces, while the dark zone contains ultramicroscopic spaces, this in

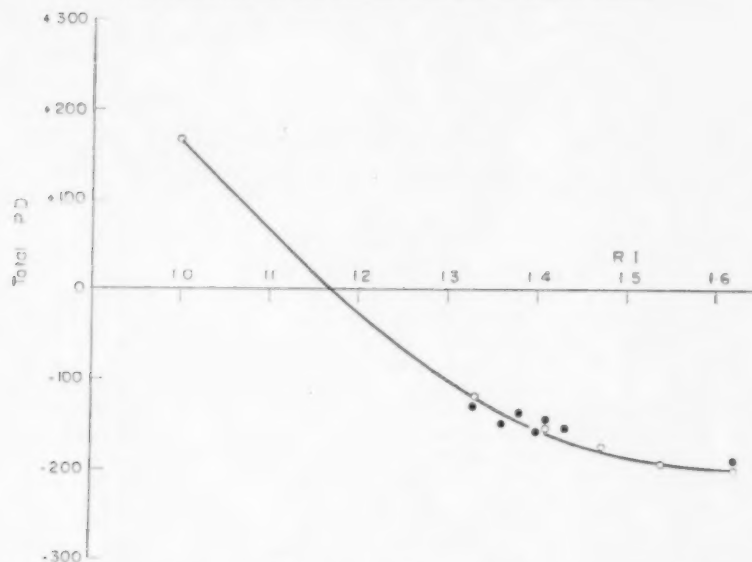


FIG. 6. Total (P.D.) related to R.I. 106/58 (E.D.) Translucent zone. O, watery media; ●, non-watery media.

itself suggests a different quality of attack between the two regions. It is known that there is some decalcification in the dark zone. No evidence has yet been produced of decalcification in the translucent zone, but its similarity to the effects of ethylene diamine strongly suggests that the translucent zone shows the effects of loss of the soluble protein in the early carious attack.

REFERENCE

- DARLING, A. I. 1958. Studies of the early lesion of enamel caries. Its nature, mode of spread and points of entry. *Brit. dent. J.* **105**, 119-135.

THE POSITION AND EXTENT OF ACID IN THE CARIOUS PROCESS

A. B. MACGREGOR

School of Dental Surgery, University of Birmingham, England

Abstract—A method is described of applying indicators to ground sections of teeth, in order to demonstrate the presence and distribution of areas of low pH in relation to the carious process. Of these indicators buffered Aqueous Methyl Red has proved the most suitable. The results are described, and attention is drawn to the fact that there is a marked lowering of pH in both carious enamel and dentine, the amount of this lowering appearing to correspond to some extent to the activity of the carious process. The area of lowered pH in the dentine at times appears to be in advance of the organisms. Attention is drawn to the fact that a visible change may occur in the dentine beneath early caries of the enamel before the penetration of organisms into the dentine. The significance of the lack of any area of low pH under sound fillings compared with the low pH found with leaking fillings is discussed. The fact that these are preliminary observations and that further work is required is stressed.

Résumé—On a mis au point une méthode pour montrer la localisation et l'étendu de l'acidité dans le processus carieux en utilisant des indicateurs sur des coupes par usure de dents cariées. L'indicateur le plus favorable est le rouge de méthyle aqueux à 0,5%. Il rougit dans la zone acide.

On peut montrer avec cette technique que le pH d'émail et de dentine altérés est plus bas que celui de la dentine et de l'émail normaux.

Si on enlève à l'excavateur la dentine molle dans la cavité jusqu'au niveau de la dentine dure, on observe une bordure acide. Si on colore par la méthode de Gram modifiée et améliorée des coupes décalcifiées, on observe qu'il y a très rarement dans cette zone des microorganismes: l'acide a donc précédé les microbes. Ceci confirme des travaux antérieurs (MACGREGOR, MARSLAND et BATTY, 1956) montrant que la décalcification précède l'invasion.

La réaction acide est plus forte dans une carie active que dans une lésion chronique et sous de bonnes obturations; même s'il y a des microorganismes, on n'observe pas de réaction acide. Il y a acidité, en cas d'obturation non étanche. Tout cela confirme les données cliniques.

On observe un phénomène intéressant lorsque la carie a pénétré l'émail sans ramollir la dentine. Dans de nombreux cas il n'y a pas de réaction acide dans la dentine, ni de bactéries, mais on voit un trajet nettement altéré dans la dentine. Ces faits suggèrent que l'altération dentinaire est induite par la présence d'acide ou d'autres substances à sa surface.

Nous décrivons brièvement des expériences de contrôle.

En conclusion nous constatons entre autre que la carie de l'émail et de la dentine est associée avec une quantité importante d'acide et que cet acide est localisé en avant de l'invasion bactérienne. De même si une obturation est bien étanche la production d'acide ne continue pas, même si quelques organismes subsistent sous l'obturation. Quelle que soit notre opinion sur la théorie protéolytique, ou celle de la chélation, il y a une grosse quantité d'acide dans l'émail et la dentine cariés, ce qui appuie jusqu'à un certain point la théorie originale de Miller.

Zusammenfassung—Es wird eine Methode beschrieben, die die Menge und die Verteilung von Säuren im kariösen Prozess zeigen soll, unter Verwendung von Indikatoren, die auf Zahnschliffe aufgetragen wurden. Als geeignetester Indikator

wurde eine 0,5 prozentige wässrige Methylrotlösung benutzt, die im Säuren ins Rote umschlägt.

Mit dieser Technik konnte gezeigt werden, dass das pH des angegriffenen Schmelzes und des Dentins weit niedriger liegt als das von normalem Dentin und Schmelz.

Wenn die erweichte Zahnschubstanz mit Hilfe eines Exkavators bis zum harten Dentin entfernt worden ist, bleibt noch eine schmale Schicht, die eine saure Reaktion zeigt, zurück. Wenn jetzt entkalkte Schnitte hergestellt und mit einer verbesserten Gram-Technik gefärbt werden, sieht man bei den Organismen diese sauren Zonen, d.h. die Säure läuft den Organismen voraus. Das stimmt mit früheren Arbeiten überein, die zeigten, dass das Weichwerden der Gewebe den Organismen selbst voraussetzt (MACGREGOR, MARSLAND und BATTY, 1956).

Aktive Karies gibt eine stärkere saure Reaktion. Unterguten Füllungen findet man keine saure Reaktion, auch wenn Organismen im Dentin anwesend sind. Saure Reaktionen werden aber beobachtet, wenn sich seitlich neben den Füllungen ein kleiner Spalt befindet. Dieses stimmt mit den klinischen Erfahrungen überein.

Ein interessantes Phänomen wird dort beobachtet, wo die Karies den Schmelz durchdrungen hat, das Dentin aber noch nicht erreicht ist. In vielen Fällen wird keine saure Reaktion im Dentin gefunden, Bakterien sind ebenfalls nicht vorhanden. Trotzdem sieht man eine deutlich veränderte Zone im Dentin. Dieses legt die Annahme nahe, dass die Veränderung durch die Gegenwart von Säuren oder anderen Substanzen auf der Oberfläche verursacht wird.

Kontrollversuche werden kurz beschrieben.

Wir können unter anderem daraus schliessen, dass sowohl Schmelzkaries als auch Dentinkaries durch relativ grosse Säuremengen verursacht wird, die den Bakterien voraussetzt. Es kann aber auch angenommen werden, dass, wenn eine Füllung gut anliegt, eine Säurebildung nicht mehr vorkommen wird, wenn auch einige wenige Bakterien noch unter der Füllung überleben sollten. Es erscheint gleichgültig, ob wir die proteolytische oder Chelattheorie vertreten: Immer ist reichlich Säure in dem kariösen Schmelz oder Dentin vorhanden. Diese Tatsache dürfte eine starke Unterstützung der MILLERSchen Theorie sein.

INTRODUCTION

THE ASSOCIATION of acid production with the carious process has been widely accepted for many years though the evidence of the actual presence of acid has been somewhat scanty. While it has been suggested that the initial attack on the enamel might be associated with acid production it has at times been stated that it was possible that the destruction of the dentine might not be associated with the presence of acid. A simple technique has been devised in order to demonstrate acid, if present, in both carious enamel and dentine.

TECHNIQUE

The crown of a freshly extracted tooth (within 4 hr of the extraction of the tooth) is cut off and multiple sections each of about 200 μ in thickness are cut through the crown with a thin diamond wheel cooled with distilled water. The sections are removed and a few drops of Sodium Methyl Red (Aqueous Acid Methyl Red neutralized with Caustic Soda pH range 4.4-6.0) are placed on the sections. In the carious teeth an immediate colour reaction is seen, the altered and carious enamel turning bright pinkish red while the sound enamel and dentine show merely a yellowish coloration. For photographic purposes, to avoid precipitation, the sections

are quickly flushed with distilled water after the indicator has been on for approximately half a minute and the water is then sucked away. Various other indicators have been tried and are discussed under the section dealing with controls, but as the majority of indicators turn to yellow on the acid side, and this colour is not so easily visible against the background of the tooth, Methyl Red has been found to be the preferable indicator.

This forms the basis of the technique and its application will be discussed under various headings.

RESULTS

1. In the grossly carious tooth there is an immediate colour reaction, both the carious enamel and the dentine assuming a bright red colour almost at once, the remarkable feature being the actual swirl of red coloration advancing into the orange indicator from the carious zones, suggesting that a relatively high percentage of acid must be, or have been, present. Early caries in the enamel, even where this has not yet penetrated into the dentine, is revealed by a red colour in the enamel. A typical example showing undermining of the enamel and gross caries which has advanced into the dentine is shown in Fig. 1.

2. Following the technique adopted in earlier work to determine the relation of organisms to the softening process in the dentine (MACGREGOR, MARSLAND and BATTY, 1956; WHITEHEAD, MACGREGOR and MARSLAND, 1960), further experiments were conducted to see the relationship of acid distribution to the organisms in the dentine. In these experiments softened dentine was first removed with an excavator down to the hard dentine below and the Methyl Red indicator was then applied to the section after removal of the soft dentine. In sections dealt with in this way a red rim was almost invariably revealed round the periphery of the cavity indicating that some acid appeared to be present in the dentine slightly in advance of the softened portion. A typical specimen treated in this way is seen in Fig. 2. After application of the indicator and photography of the specimen it was decalcified and serial sections cut by the normal paraffin wax technique. The sections were then stained with a modified Gram's method devised by SIDAWAY and described by MACGREGOR *et al.* (1956), this having been found to give a better staining of organisms than the normal Gram technique. These serial sections when examined under the microscope showed the relationship of any organisms present to the area of dentine below the cavity which had been shown to give an acid reaction. In some of these specimens no organisms were present in the dentine below a cavity even though this area had previously given a marked acid reaction. In others organisms were present in a few small superficial isolated clumps, but these were not present in sufficient quantity to explain the marked red rim at the bottom of the cavity indicating the presence of acid over a considerable area. In a few teeth a more massive infiltration of the dentine by organisms was present but this generally fitted the macroscopic picture and if red staining were seen extending from the rim round the base of the cavity it normally coincided with the presence of deeper organisms in the dentine. A section is shown (Fig. 3) from the tooth illustrated in Fig. 2. This shows no organisms at the base

of the cavity in spite of a pink rim being present. It is of some interest to note the contrast in this section between the floor of the cavity free of organisms in the dentine, and a small area at the cervical margin where soft caries was not removed. In this latter area a small group of tubules containing organisms is seen.

3. An unexpected phenomenon has been found in several teeth with caries of the enamel that had just penetrated to the amelo-dentinal junction. A marked red zone indicating a low pH is present in the enamel up to the amelo-dentinal junction but although an altered tract in the dentine is observed below this there is no red stain in this tract (Fig. 4). After taking sections of these teeth and staining with the modification of Gram's stain, organisms have been seen at the outside of the dentine in the area of the amelo-dentinal junction but no organisms have been seen in the dentine itself (Fig. 5). This suggests that irritation by toxins from the organisms, possibly the presence of acid, or some other mechanism may "trigger off" the change in the dentine seen as an altered tract before the actual entry of organisms.

4. A few teeth have been investigated having been extracted from elderly patients, the teeth showing old chronic hard caries. In such specimens while there may be a very slight reddish tinge in the dentine in association with the hard caries, it is not comparable with the extent and deepness of red colour seen in active caries (Fig. 6).

5. A number of teeth with sound amalgam fillings and some with unsound amalgam fillings with a leak by the side have been investigated. Under sound fillings there is no red coloration in the dentine under the filling (Fig. 7). In unsound fillings with a leak along the side between the filling and the dentine a red coloration is seen in the dentine.

Control experiments

Other indicators including Bromcresol Purple, Bromcresol Green and Chlorphenol Red, among others, have been tried. As said earlier, however, as these indicators turn to yellow on the acid side they are not so easy to distinguish on the background of a tooth. Enough sections have been done, however, to show that the areas giving an acid reaction appear to be common to all the indicators (Fig. 8). In the case of Chlorphenol Red the pH of altered enamel and dentine was below 5.5 and with Bromcresol Green it appeared to be below 5.0. It is remarkable that enough acid apparently remains in the tooth to affect the indicator even after the grinding process with distilled water washing over the sections. Further control experiments were done by cutting a hole with a drill into the crown of a sound tooth, fitting in a polythene tube, and allowing buffered lactic and formic acid to come into contact with the dentine on the floor of the cavity for 48 hr. After this time the teeth were washed, ground sections were taken and the indicators added. The dentine below these artificial cavities showed a very similar reaction to that shown in association with dental caries. To make sure that decalcified dentine matrix did not react in any way with the indicator to give a red coloration, matrix itself has been tested but does not appear to give any acid reaction at all. It is assumed, in consequence, that the change in indicator colour is giving an indication that acid is, or has been, present.

DISCUSSION

In view of the theories of the mechanism underlying the carious process it is of interest that quite a considerable amount of acid must at least be associated with the process in both the enamel and the dentine. Even early altered enamel shows a low pH and the amount of acid present in rapid active caries of the dentine is sufficient for a red swirl of colour to be seen coming out into the indicator when it is placed on the section, apart from the instant change in colour of the carious dentine itself. It cannot, on the available evidence, be said that acid (even if as shown by indicators the pH is at least below 5.0) is actually decalcifying the enamel and dentine, though it is strongly suggestive. It can at least be said, however, that the carious process is associated with a lowering of the local pH.

Earlier work on the relationship of organisms to softening in the dentine (MACGREGOR *et al.*, 1956; WHITEHEAD *et al.*, 1960) suggested that in the majority at least, of carious teeth, the softening of the dentine appears to precede the organisms associated with it. The experiments described above in which softened dentine was removed before the application of indicator, subsequent to which an acid zone appeared to be present in front of the softened dentine, coupled with the paucity of organisms in this acid zone, support the hypothesis that softening precedes the organisms in the dentine. The association of a low pH with this area of softening in advance of the main body of organisms is at least suggestive that the low pH and the softening are linked. Attention is drawn to the fact that in some teeth with early caries where the enamel had been breached there was an acid reaction in this carious enamel but not in the dentine, and there was a marked altered tract that could be seen with the naked eye in the dentine underlying the carious lesion, despite the absence of any organisms in any part of the tract. From this it would appear that some alteration of the dentine underlying an early carious lesion can occur before the entry of organisms. The precise mechanism by which this alteration is initiated is not clear, but it is a matter of some interest and further work is clearly needed on this point.

The absence of marked lowering of pH with old chronic caries and the lack of acid reaction under sound fillings when compared with the marked acid reaction in active caries fits the clinical picture. Work carried out both by us at the Birmingham School and in other parts of the world has shown that the dentine underlying fillings is by no means always sterile and that organisms can be grown from it. The absence of an area of low pH under sound fillings would suggest that the sealing off of the organisms from the mouth fluid and food substrate inhibits acid formation even though the organisms themselves may remain viable. Support to this hypothesis is given by the fact that in the unsound filling with a leak between the filling and the tooth where mouth fluid and food substrate can reach, an acid reaction is found. Much further work is needed to validate or invalidate the hypothesis advanced, but it is hoped that this demonstration of an area of low pH and its position relative to the carious process and the organisms concerned, may at least present a new platform from which further attacks on the problem can be launched.

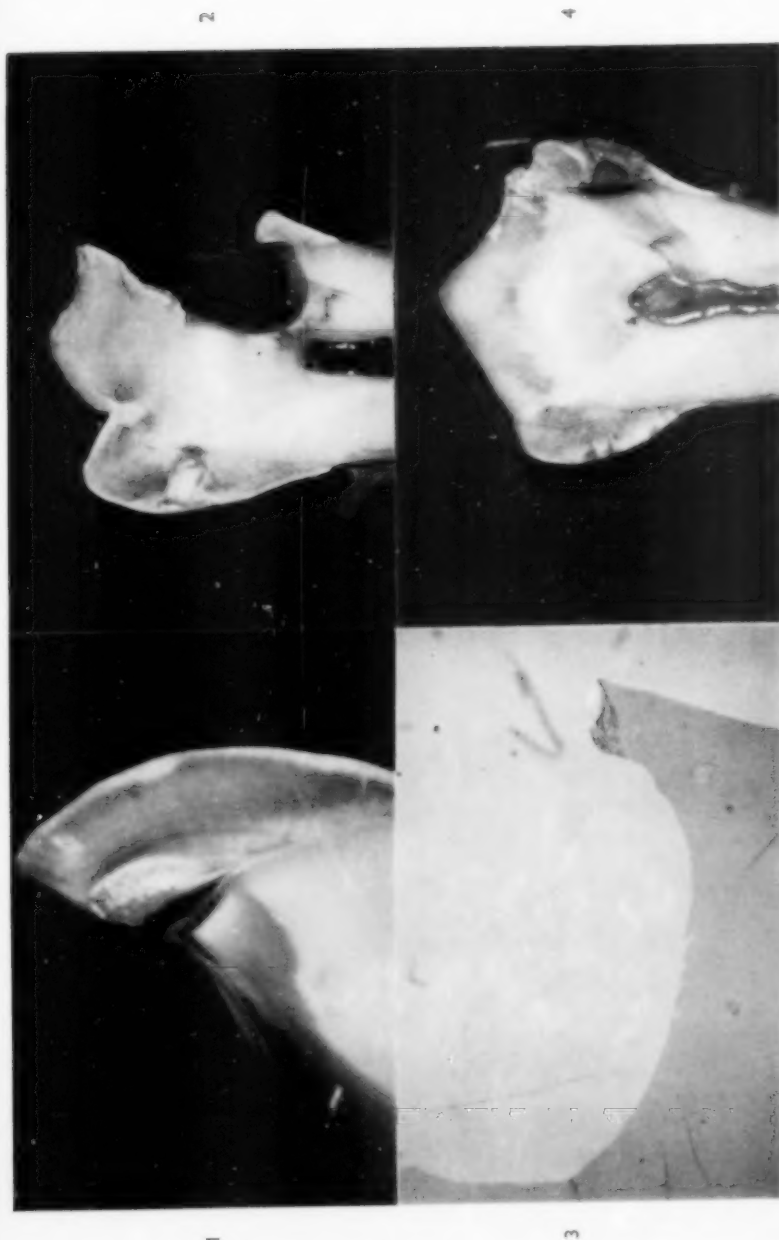


FIG. 1. Ground section of premolar tooth after application of Methyl Red indicator. Note red coloration of the underlying carious enamel and the red coloration at the advancing edge of the carious process in the dentine. $\times 10$ (approx.).

FIG. 2. Ground section of premolar tooth after removal of the softened dentine with excavators and application of indicator. Note red rim on floor of cavity due to area of low pH in advance of the softened dentine. $\times 8$ (approx.).

FIG. 3. Photo-micrograph of decalcified section taken from the same specimen as shown in Fig. 2 and stained with a modification of Grams' stain to show organisms. Note absence of organisms on floor of cavity where red rim was present, contrasting with a few tubules containing organisms at the cervical margin of the cavity where a small piece of softened dentine had not been removed. $\times 15$.

FIG. 4. Ground section of premolar tooth showing red area in carious enamel but red coloration not extending into the altered tract in dentine below lesion. $\times 8$ (approx.).

1. The first part of the report is a general introduction to the subject of the study.

Vol.
4
1961

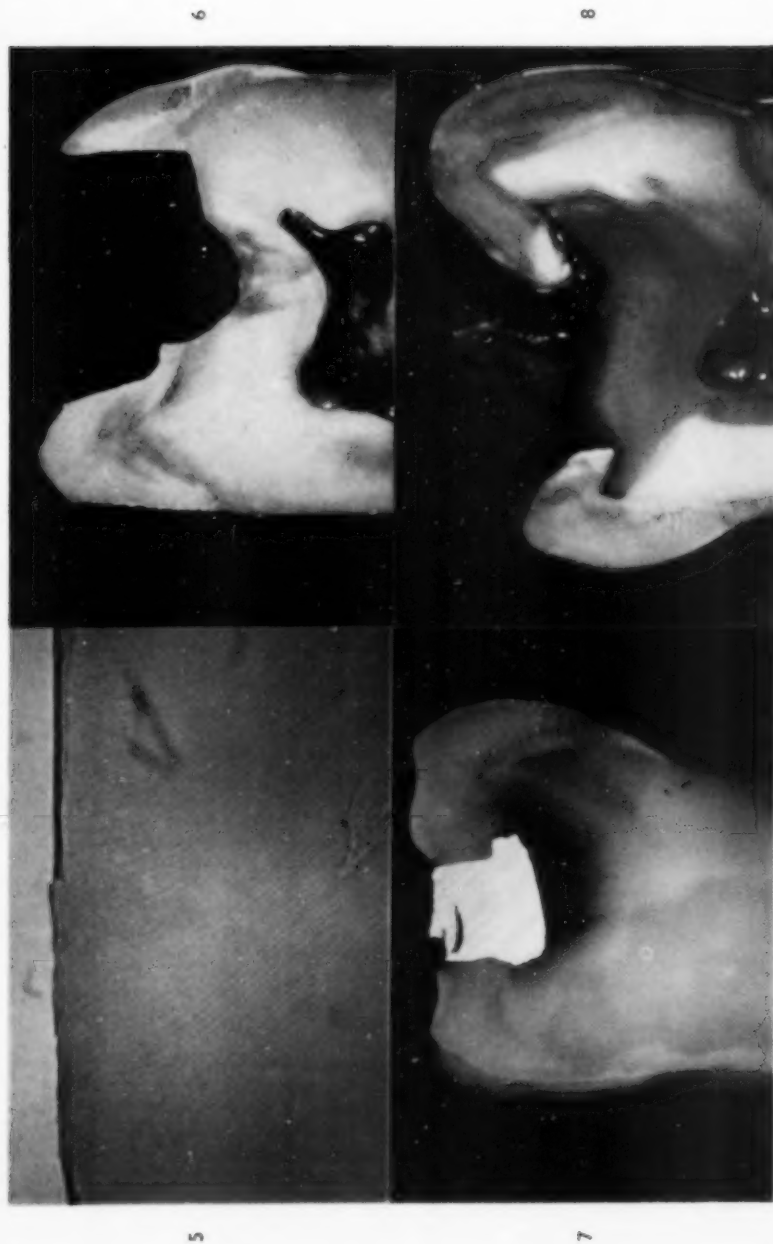


FIG. 5. Decalcified section of same area of tooth shown in Fig. 4 stained with modification of Gram's stain showing that although there are changes in appearance between the dentine in the altered tract underlying the lesion, compared with normal dentine, no organisms are present in it. (Rotated through 90°). $\times 35$.

FIG. 6. Ground section from upper third molar of elderly patient, after excavation of carious dentine down to the hard floor of the cavity. Note the very small red coloration on the floor compared with that seen in more active caries. $\times 8$ (approx.).

FIG. 7. Ground section of molar tooth showing absence of any red coloration under sound amalgam filling after application of indicator. $\times 8$ (approx.).

FIG. 8. Ground section of molar tooth after application of Chlorphenol Red indicator. Note this indicator changes from red to yellow on the acid side, and it will be seen that the areas of low pH are again in the undermined enamel and on the advancing edge of the carious process in the dentine. $\times 8$ (approx.).

Vol.
4
1961

Acknowledgements—I would like to record my gratitude to Dr. E. A. MARSLAND, who has checked many of the histological specimens with me and who most kindly took the photo-micrographs. Dr. S. L. ROWLES, of the Medical Research Council Staff, has given me great help with information on indicators and their preparation. He was also responsible for the preparation of the decalcified dentine matrix. Messrs. LEES, JOHNSON and COOPER, of the departmental technical staff, have, as always, given the most loyal help and assistance in the preparation of sections, and for the colour photographs of teeth after the application of indicator I am most grateful to Mr. JOHNSON.

REFERENCES

- MACGREGOR, A. B., MARSLAND, E. A. and BATTY, I. 1956. Experimental studies of dental caries—II. The relation of bacterial invasion to softening of the dentine in permanent and deciduous teeth. *Brit. dent. J.* **101**, 230–235.
- WHITEHEAD, F. I., MACGREGOR, A. B. and MARSLAND, E. A. 1960. Experimental studies of dental caries—I. The relation of bacterial invasion to softening of the dentine. *Brit. dent. J.* **108**, 261–265.

A MICROCHROMATOGRAPHIC STUDY OF THE PENETRATION OF ENAMEL BY C^{14} -LABELLED GLUCOSE

J. H. FREMLIN and J. MATHIESON

Birmingham University, England

Abstract—It is shown that, when a tooth is partially immersed in a solution of glucose, material is liable to migrate over the unimmersed surface. Methods of preventing this are described. By making autoradiographs of chromatograms on thin paper strips, the very small quantities of active material penetrating to the interior of the tooth have been identified as glucose.

Résumé—Une solution de glucose, contenant du carbone radioactif C^{14} , est appliquée à la surface de l'émail de dents saines *in vivo*. Différentes méthodes ont été essayées pour empêcher la pénétration du glucose sous les autres surfaces dentaires. Le glucose pénètre facilement à travers la surface hydrophil de la dent sous des vernis hydrophobes tels que cire, graisse, poix, vernis à ongle etc. . . La seule méthode effective est de sceller un tube étroit de polyéthylène à la surface de l'émail, puis de le remplir avec la solution radioactive. On bouche le tube et on place le tout dans un dessiccateur contenant du P_2O_5 afin que les autres surfaces dentaires restent sèches.

Après plusieurs jours, la solution est enlevée. La dent soigneusement lavée, est débitée en coupes séries transversales et longitudinales. Des autoradiographies sont faites avec un film radiographique Fluorodak. Une activité radioactive a été retrouvée dans l'émail et s'est aussi accumulée dans la dentine et la pulpe. Des fragments ont été prélevés au niveau des coupes autoradiographiques, dans les régions riches en matériel radioactif, et analysés chromatographiquement pour voir s'il s'agissait bien de glucose et non de molécules actives plus petites, produits du métabolisme bactérien ou enzymatique. Le tissu radioactif a été extrait avec de l'eau distillée chaude. Des gouttes d'extrait furent placées sur du papier Whatman No 54 de 1,5 mm de large. Des échantillons de contrôle de glucose radioactif, de lactate et de carbonate ont été placés sur des papiers similaires, ainsi que la série de papiers imbibés avec le mélange standard de *n*-butyl alcool-acide acétique et d'eau. Finalement, les papiers sont séchés puis autoradiographiés. Il ressort ainsi que la majeure partie de la radioactivité observée au niveau des coupes est bien due au glucose.

Zusammenfassung—Eine Lösung von C^{14} -markierter Glukose wurde *in vitro* auf gesunde Schmelzbezirke einer Anzahl von Zähnen gebracht. Hierbei wurden verschiedene Methoden ausprobiert, um die restliche Zahnoberfläche abzudecken, damit die Glukose dort nicht eindringt. Die Glukose zeigte eine starke Tendenz, sich unterhalb der hydrophoben Abdecksubstanzen wie Wachs, Fett, Pech, Nagellack u.a. und auf der hydrophilen Schmelzoberfläche auszubreiten.

Als zuverlässig erwies sich allein folgende Methode: Das Ende eines dünnen Polyäthylenschlauches auf der Zahnoberfläche befestigen, einen Tropfen der radioaktiven Flüssigkeit hineinbringen und fest verschliessen. Dann den ganzen Zahn in ein Gefäss mit Phosphor-Pentoxyd bringen, um die übrige Zahnoberfläche trocken und völlig wasserfrei zu halten. Nach einigen Tagen wird der Schlauch entfernt, der Zahn gründlich abgespült und längs oder quer in Serie geschnitten.

Von diesen Schnitten wurden autoradiographische Aufnahmen mit Fluorodak-Röntgenfilm hergestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die radioaktive Lösung regelmässig den Schmelz durchdrungen und sich im Dentin und der Pulpa angesammelt hatte. An geeigneten Stellen wurde radioaktives Material von den autoradiographisch untersuchten Schnitten abgekratzt und chromatographiert, um sicherzustellen, dass

die durch den Schmelz diffundierte Substanz wirklich Glukose war und nicht kleinere radioaktive Moleküle, die durch bakterielle oder enzymatische Abbauprozesse entstanden waren. Das radioaktive Material wurde mit warmem, destilliertem Wasser extrahiert. Der Extrakt wurde auf 1,5 mm breite Streifen von Whatman-Papier Nr. 54 aufgetragen. Ähnliche Streifen wurden mit Kontrollproben von markierter Glukose, markiertem Lactat und Carbonat beschickt. Die Papierstreifen wurden dann mit einer Mischung von Standard-*n*-Butyl-Alkohol-Essigsäure-Wasser berieselt. Schliesslich Trocknung und autoradiographische Untersuchung der Streifen. Letztere bestätigte, dass es sich bei dem grössten Teil der durch den Schmelz diffundierten radioaktiven Substanz um Glukose gehandelt hatte.

IN THIS PAPER will be discussed methods which have been developed for the study of the penetration of dental enamel by carbohydrates, with the help of the radioactive isotope C^{14} used as a tracer.

Some preliminary results of the investigation will be given by Dr. HARDWICK in his paper.

The basic principle employed is simple enough. We bathe a tooth or part of a tooth in a solution of the carbohydrate to be investigated, a fraction of the carbohydrate molecules being labelled with C^{14} . Since we are concerned with the physical traversal of the enamel by complete unchanged molecules of the substance investigated, it is of no importance in which part of this molecule the labelling occurs. Conditions are made such that bacterial action is unlikely. After a few days or perhaps a week or two, the tooth is removed, washed thoroughly and sectioned. The sections are then placed against an X-ray film for a suitable time to obtain an autoradiograph. Since the range of the β particles from C^{14} is short, autoradiographs of excellent resolution can be obtained, showing in detail the dental structures in which the radioactive material is most likely to be found. Several examples of these are given by Dr. HARDWICK in his paper.

This gives the impression that the whole problem could be solved in a week or two for any substance desired. In practice, however, several difficulties of interpretation arise if we content ourselves with the simple experiment described. We shall deal with two only of these, which we believe to be the most important.

The first problem is to ensure that penetration did in fact occur through the enamel, and not elsewhere on the tooth surface. Penetration through the cementum or through cut surfaces of dentine is extremely rapid and so we must make quite certain that active solution cannot reach such surfaces.

In our first experiments we suspended the teeth with their crowns only dipping into a small quantity of active solution in a sealed tube, the root of each tooth being lightly greased. We found that a serious degree of evaporation from the solution, followed by condensation on the rest of the tooth, took place. Of course, such substances as glucose will not evaporate but they may well diffuse over the entire tooth surface if this condensate makes liquid contact with the active solution. Trials showed that the grease could not be relied on to protect the more penetrable regions of the surface.

Our next plan was to cover a tooth, which had just been dried in warm air, with some hydrophobic substance, leaving a small area of enamel exposed for the experi-

ment. Among substances tried have been dental wax, silicone grease, pitch, "Bostik" (a commercial rubber-based adhesive), nail varnish, "Araldite" resin and electroplating with silver. Several of these appear to be satisfactory in some cases but not always. It is likely that the dental wax and the pitch develop micro-cracks at the low temperature ($2-4^{\circ}\text{C}$) which we use for the main experiment. The hydrophilic nature of the tooth surface combined with the high surface tension of water then led to the creeping of a continuous film along the tooth surface below the protective layer. We are very grateful to Mrs. S. M. MORSY for making a number of tests of teeth completely covered with the various substances described, using Cs^{137} as a detector of penetration of the protection. In Fig. 1 is shown an autoradiograph of a section of a pitch-covered tooth showing several points of penetration through the pitch.

The most reliable method found so far is an inverted arrangement in which we cement a small polythene vessel to the area of tooth to be treated, load it with a drop of solution, and seal it off. The whole tooth is then placed in a vessel containing phosphorus pentoxide to keep the rest of the tooth surface dry and free from any watery film. In Fig. 2 the arrangement is shown together with two further teeth protected by methods described above. Using the polythene tube method we have so far seen no evidence of any activity on the outside of the enamel outside the region of the cemented tube. The method is troublesome however and we hope that one of the other methods may be made reliable.

The second main problem is to prove that the radioactivity observed inside the tooth is in fact due to unchanged molecules of the substance under test. While we use propylene oxide to inhibit the growth of micro-organisms in the solution, we felt it desirable to confirm that there was no degradation of the large molecules, of the substances under investigation, into smaller molecules such as carbon dioxide which might penetrate more easily.

The method employed was an adaptation of conventional paper chromatography.

Small quantities of active material were removed with a steel scraper from parts of a tooth section which could be seen to be active by means of an autoradiograph of the section. These were extracted with a drop of warm water for a few hours and the extract evaporated down to a cubic millimetre or less. Samples of a standard volume were then placed in a row on the chromatographic paper (Whatman No. 54) together with samples of the appropriate active standard solutions. For example, when we had soaked a tooth in glucose (as a 20% solution in water) we might put on samples of glucose, sodium lactate and sodium carbonate all labelled with C^{14} .

Sufficiently nearly identical small samples could be transferred with great speed and convenience with the help of a platinum loop, made to lift a hundred or so micrograms of an aqueous solution. The loop could be cleaned completely and practically instantaneously by passing it through a flame. The irrigant fluid used was the upper phase of the system produced by shaking together *n*-butyl alcohol, acetic acid and water in the ratio 4:1:5.

This was allowed to flow down the paper for 2-3 hr when a good separation is obtained, the lactate moving farthest and the carbonate moving hardly at all. Not

very much of the carbonate seems to get lost in spite of the acid conditions. The quantities used, even of the controls, are rather small for the use of chemical indicators, so here again an autoradiograph is made to show the final positions of the spots. In Fig. 3 is shown an early control set, displaying the clear separation between glucose and lactate, each sample containing perhaps 10 μ g of solid substance.

It will be seen that there is a considerable spread both along the direction of movement of the irrigating fluid and transversely to this. This increased by a large factor the X-ray film exposure needed. For a given paper, fluid and temperature, the longitudinal spread is inevitable but the sideways spread can easily be controlled by using narrow strips of paper. We have made these as narrow as $\frac{3}{4}$ mm but we usually use 1 $\frac{1}{2}$ mm strips which are easier both to cut and to handle (Fig. 4). The sharp concentration at the edges of each strip aids visibility on the autoradiograph very considerably and we find that the film exposure needed to give a just-visible trace is reduced by 20–50 times from that for the same total activity on the continuous area of paper. We have also tried cotton threads, which give a very fair separation but their great variability makes them inconvenient in use. Some of our smaller samples, which even on the strip system may need a month or more exposure of Flurodak (the single-coated film that we normally use) would be quite impossible to observe by the standard method, apart from its inconvenience. In the year or so of exposure needed the decay of latent image and the growth of fog would between them make observation impossible however long a time might be employed. In Fig. 5 is shown the autoradiograph of a section of a glucose-soaked tooth to which this method was applied. In Fig. 6 is shown the chromatograph in which samples of material from enamel and pulp were alternated with controls of active glucose, lactate and mixtures of these. (Controls are not used for carbonate as this does not move down the paper). A month's exposure was used and the contrast of the resulting film has been increased photographically. While this could not be said to prove that there was no lactate present, I think it is clear that much the greater, and only observable, part in both tissues consists of glucose.

We may now summarize our experimental results by saying first that activity from a solution of labelled glucose can pass through normal enamel in suitable conditions and second that the greater part of this activity is still chemically in the form of glucose. The mechanism of penetration is discussed by Dr. HARDWICK.

The quantity of glucose detected by the means described is surprisingly small considering that we used the very low initial specific activity of about 1 mC per gram of glucose. Specific activities hundreds of times higher than this are available, with a corresponding increase in sensitivity. The activities shown in the enamel in the chromatograph of Fig. 6 correspond to about 10^{-9} g of total glucose. The tissue samples taken for extraction with water were about 2 mg and extraction efficiency was probably in the region of 25 per cent. The amount of glucose actually observed to penetrate and to be retained in the tissues is then only a few parts per million. The amount in the pulp may rise to higher values given plenty of time but even so would need time of the order of years of continual soak in 20% glucose to reach 0.1 per cent. As a source of glucose for bacterial metabolic activity below a filling, therefore, glucose

passing through the enamel round the filling must be quite negligible compared to that reaching the same region through the dentine from the pulp, which will presumably always contain glucose at a normal blood figure of some hundreds of parts per million. It might be felt that penetration *in vivo* at body temperature might be a lot faster than *in vitro* at 2°C. This does not seem likely to be the case. It is very difficult to see any physical reason why there should be any difference apart from the 5 per cent or so arising from the fact that diffusion rates vary as the square root of the absolute temperature. Since the glucose remains chemically unchanged it is not easy to see why any chemical or biological factors should enter at all unless a large rise in the water content of dental tissues occurs with rise of temperature which is hardly probable.

Acknowledgements—Our thanks are due to the Medical Research Council of the United Kingdom for financial assistance; to Miss RUTH HARVEY, Miss JEAN ALDRIDGE, Miss JENNIFER LOWE and Mrs. S. M. MORSY for their careful technical assistance; and to Dr. E. A. MARSLAND and the staff of the Department of Dental Pathology of the University of Birmingham for help with the preparation of sound sections of teeth.

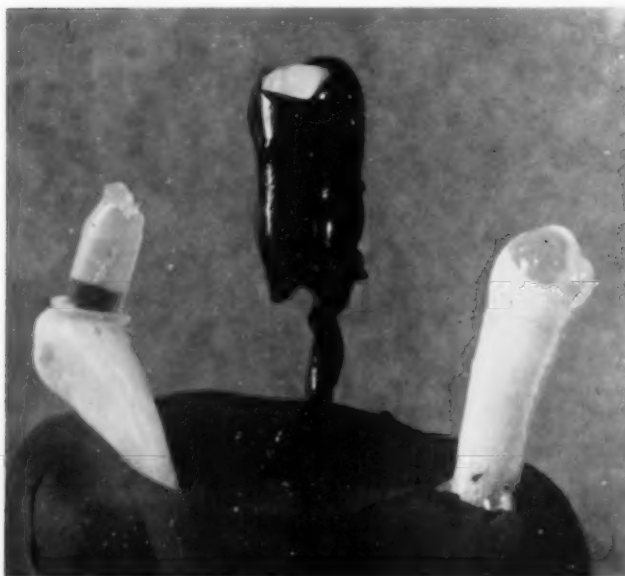


FIG. 2. Right: tooth protected by clear "Bostik" apart from a small area covered by solution investigated.

Centre: tooth similarly protected by pitch.

Left: tooth to which is cemented a small sealed polythene tube containing solution. Solutions contain contrasting dyes to improve visibility.



FIG. 1. Autoradiograph of sections of a tooth which, prior to sectioning, had been entirely covered with pitch and bathed for 24 hr in a solution of $Cs^{137}Cl$. At least three points of passage through the pitch are clearly seen.

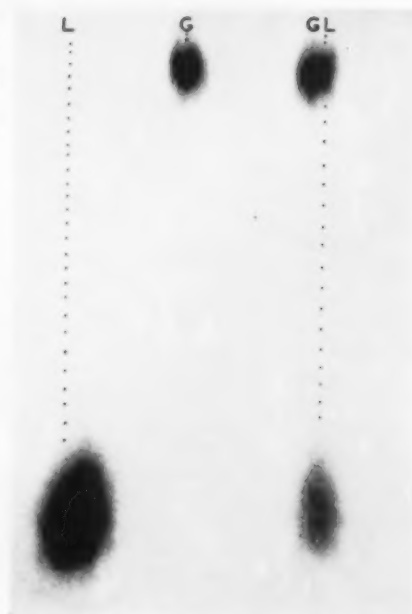


FIG. 3. Control autoradiograph of chromatogram showing the separation of lactate and glucose (GL). Control samples of glucose (G) and lactate (L) are included for comparison.



FIG. 5. Autoradiograph of section of radio-glucose-treated tooth; soaking time 30 days at 2 C.

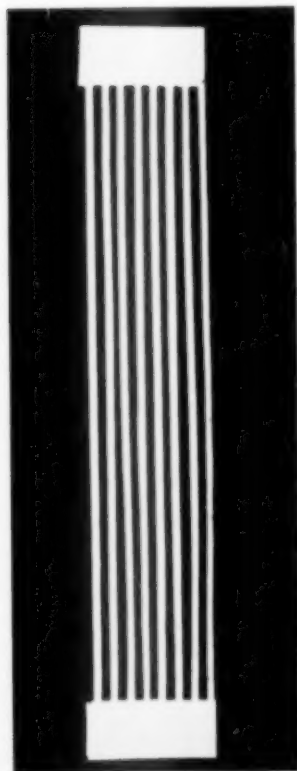


FIG. 4. Filter paper strips prepared for final chromatograms.



FIG. 6. Autoradiograph of chromatogram of samples of enamel and pulp from the section of Fig. 5. E—enamel, P—pulp, G—glucose control, L—lactate control, GL—glucose plus lactate control.

ISOTOPE STUDIES ON THE PENETRATION OF GLUCOSE INTO NORMAL AND CARIOUS ENAMEL AND DENTINE

J. L. HARDWICK

The Department of Preventive Dentistry, University of Manchester, England

Abstract—Fifty recently extracted carious and sound teeth of varying age groups were immersed in C^{14} labelled glucose solution for periods up to 10 weeks. Examination of autoradiographs of serial sections of these teeth has shown that glucose penetrates quickly throughout the full extent of carious lesions and of enamel of defective structure and along enamel lamellae. There is evidence that glucose sometimes penetrates into small areas of apparently sound enamel of recently erupted teeth. Glucose penetrates normal dentine quickly but usually does not pass through the "calcific" barriers around dead tracts in dentine.

Résumé—Cinquante dents fraîchement extraites, saines ou cariées, provenant de individus d'âge varié ont été immergées dans une solution de C^{14} glucose pendant des périodes allant jusqu'à 10 semaines. L'examen de coupes sériées par l'histaautoradiographie a montré que le glucose marqué pénètre rapidement dans tout l'émail carié ainsi que dans celui dont la structure est déficiente et le long des lamelles de l'émail. On a observé que le glucose pénètre aussi quelques fois dans de petites portions d'émail d'apparence saine provenant de dents ayant fait récemment éruption. Le glucose pénètre rapidement dans la dentine mais d'ordinaire ne traverse pas la barrière calcifiée bordant les trajets de dentine morte.

Zusammenfassung—Fünfzig frisch extrahierte kariöse und gesunde Zähne von Personen verschiedenen Alters wurden für eine Dauer bis zu zehn Wochen in C^{14} -markierte Glukoselösung getaucht. Die autoradiographische Untersuchung von Serienschnitten dieser Zähne zeigte, dass die Glukose die kariösen Läsionen in ihrer ganzen Ausdehnung schnell durchdringt. Gleiche Beobachtungen konnten an geschädigten Schmelzstrukturen und entlang der Schmelzlamellen gemacht werden. Es liegen Beweise vor, dass Glukose manchmal in kleine Bezirke von anscheinend gesundem Schmelz erst kürzlich durchgebrochener Zähne eindringt. Glukose durchtränkt gesundes Dentin schnell, vermag jedoch die "kalzifizierten" Barrieren in der Umgebung abgestorbener Dentinzonen in der Regel nicht zu durchdringen.

INTRODUCTION

IT IS IMPORTANT to determine whether the enamel is permeable to glucose for two reasons:

First, the direction of "osmotic currents" within the enamel will largely depend on its level of permeability. Such "currents" will influence the direction and the rate of spread of the carious lesion. In addition, they will largely determine the nature of any modifications of the chemical content of the enamel after eruption and whether such alterations in its constituents are derived mainly from the external environment of the tooth or from the pulp via the dentine.

Secondly, glucose is a common source of energy for bacteria which usually break it down to acid end products which are generally considered to be highly important

in the carious process. It is one of the breakdown products of starches and sucrose and is a major constituent of the commercial "glucose" so often used nowadays in the manufacture of food and drinks; therefore, most food debris left around the teeth in the oral cavity will eventually contain some glucose. If bacteria are able to enter the enamel, there will certainly be channels along which the much smaller glucose molecules can also penetrate. However, in restorative dentistry viable bacteria are usually left in the prepared cavity, especially near the amelo-dentinal junction: if the overlying enamel is permeable to glucose, it is probable that the carious process will continue slowly, eventually causing the failure of the filling, even though there is an adequate seal between the restorative material and the enamel.

Polarized light studies show that enamel can be imbibed with quinoline which has a molecule slightly larger than that of glucose. This observation suggests that the level of molecular size which permits penetration of enamel by particles is about the size of the glucose molecule.

METHOD

In the original experiments the roots and the cervical part of the crowns of recently extracted teeth were covered with dental wax and the occlusal half of the crowns was immersed in a 20% solution of glucose to which C^{14} labelled glucose had been added.

Bacteria which were present on the tooth surface or in any carious lesion might metabolize this glucose breaking it down into smaller particles to which the enamel was permeable. It was, therefore, essential to inhibit bacterial metabolism during the experiments without altering the permeability of the enamel by the bactericidal treatment. Attempts were made to inhibit bacterial metabolism by:

- (1) Raising the osmotic pressure by the addition of non-radioactive glucose up to the level of 20 per cent.
- (2) Carrying out the experiments at 3°C which would slow up the rate of bacterial metabolism considerably.
- (3) The addition of soluble penicillin which will destroy most acidogenic bacteria. Unfortunately some bacteria, such as the monilia, are not sensitive to penicillin and are relatively insensitive to high osmotic pressures but are able to produce acid end products from glucose. In some experiments, therefore, propylene oxide was used as an alternative bactericide.

At the end of the period of immersion a rough check on whether the glucose had been broken down was carried out by estimating the pH of the glucose solution. In all experiments carried out for under 3 weeks there were no significant rises in hydrogen-ion concentration and in longer term experiments the rise was slight. Such estimations of pH, however, could not be relied on to demonstrate that small amounts of acid had not formed because the tooth substance would provide some buffering capacity.

Subsequently at varying periods up to 10 weeks the teeth were withdrawn from the glucose solution and thoroughly washed in water. The wax coating was removed and serial sections of about 250 μ thickness were prepared from the teeth for autoradiographic and histological examination. Autoradiographs of the sections were

prepared by carefully embedding them in wax, plasticine or polystyrene, so that one cut surface came into direct contact with the photographic film (blue sensitive single sided Flurodak), thus reducing the scatter of electrons from the other surfaces of the section. After exposure for an adequate period, the autoradiographs were developed and subsequently the histological sections were examined for carious and other lesions under the optical microscope and magnifying lenses. In a few cases the sections were ground down with aloxite and diamond dust suspended in an oily base to about 25 μ to make them more suitable for microscopical examination.

FINDINGS FROM THIS RESEARCH

Over fifty teeth recently extracted from patients of different ages have been treated with the glucose solution and nearly one thousand autoradiographs prepared from sections of them. A correlation of the appearances observed in these autoradiographs shows that:

(1) Radio-activity was present within some areas of the dentine and pulp in every tooth which had been immersed in the radio-glucose for more than 1 day.

(2) Radio-activity penetrated in a few hours throughout the full extent of all carious lesions as seen under the optical microscope.

(3) Radio-activity was present within some areas of enamel which clinically had appeared normal but which under the optical microscope showed an early carious lesion or some defective structure.

(4) Transverse sections of the enamel showed that radio-activity often enters the enamel quickly along the lines of the enamel lamellae or cracks.

(5) Usually no radio-activity could be demonstrated within enamel which appeared normal and well calcified both clinically and microscopically. Occasionally slight radio-activity was observed in the middle or deeper layers of apparently normal enamel of recently erupted teeth, especially near the cusps of the teeth. These areas apparently correspond in situation to less highly calcified parts of enamel.

(6) In the teeth of some patients marked radio-activity was observed along lines of interglobular dentine.

(7) Penetration of the glucose occurs slowly through the enamel and quickly through the underlying dentine. Later the whole of the dentine is penetrated by radio-glucose as a result of centrifugal passage out from the pulp cavity.

(8) The "calcific" barriers around dead tracts in dentine are highly impermeable and usually show no radio-activity.

Typical autoradiographs illustrating some of these observations are shown in Figs. 1-5.

DISCUSSION

The invariable demonstration of radio-activity within the dentine and pulp after the immersion of a tooth for more than 1 day in radio-glucose solution suggests that some of the enamel of all teeth is permeable to glucose: it does not necessarily show that areas of completely sound enamel without lamellae are permeable to it. In our original experiments there could have been two additional explanations of this observation.

First, the seal provided by wax applied to the root and neck of the tooth might not be effective. As Dr. FREMLIN has shown in his paper, subsequent experiments demonstrated that wax was not an effective seal after the tooth, which had been coated with molten wax, was cooled to 3°C. Presumably, minute breaks in the seal occurred due to differences in the coefficients of expansion of enamel and of wax. Despite the frequent lack of an effective seal over the roots, it was often possible to determine by examination of the distribution of the radio-activity as shown in many of the autoradiographs of the serial sections of the teeth that most of the radio-activity within the pulp and dentine had not entered the tooth through the root surfaces.

Secondly, there was the possibility that although no significant drop in pH had been demonstrated in the glucose solution at the end of the experiment, the buffering of the pH by the dissolving of some of the enamel had masked acid formation and that actually bacterial metabolism had continued under the conditions of the experiments to a significant extent. As a result smaller molecules and ions carrying the carbon labelling might have been formed from the glucose. The radio-activity demonstrated within the dentine and pulp might have been due to passage through the enamel of these C¹⁴ labelled breakdown products and not of the radio-glucose. However, Dr. FREMLIN in his paper has shown that most, and probably all, of the radio-activity within the dentine and pulp of teeth with sound enamel was due to C¹⁴ labelled glucose and not to C¹⁴ labelled breakdown products of glucose.

In the light of Dr. FREMLIN's findings the examination of all the autoradiographs suggests that at least in most of the teeth C¹⁴ labelled glucose had reached the dentine and pulp by passing through the enamel. There is to date no conclusive evidence that the passage of glucose through the sound enamel of older teeth did not occur entirely along lamellae or cracks but there is strong evidence that some areas of enamel without lamellae in recently erupted teeth are permeable to glucose. The amount of glucose diffusing through clinically sound enamel is without doubt very small: it is probable that the rate of acid formation as a result of bacterial metabolism on glucose diffusing through sound enamel into a prepared cavity with a sound filling would not cause sufficient drop in pH to affect the life of the restoration significantly. Carious enamel and some areas of enamel with defective structure are quickly penetrated by glucose. The rate of diffusion of glucose through any such carious enamel or enamel of defective structure at the edges of a prepared cavity is so rapid that it would be reasonable to believe that it will prejudice the life of a restoration considerably.

Acknowledgements—Our thanks are due to the Medical Research Council of the United Kingdom for financial assistance; to Mrs. J. MATHIESON, Miss JEAN ALDRIDGE, Miss JENNIFER LOWE and Mrs. S. M. MORSY for their careful technical assistance; and to Dr. E. A. MARSLAND and the staff of the Department of Dental Pathology of the University of Birmingham for their help with the preparation of ground sections of teeth.

FIG. 1. Serial autoradiographs of a premolar tooth of a male patient, aged 12, of which the crown had been immersed for 8 weeks in C^{14} labelled glucose solution. $\times 2$.

Note radio-activity shown within the sound enamel at "B".

"A" represents a halo of exposed film around the section produced by electron scatter from the root surface where the adaptation of the section to the wax was not close during autoradiography and where the wax seal around the root had not been effective whilst the tooth was immersed in the radio-glucose.

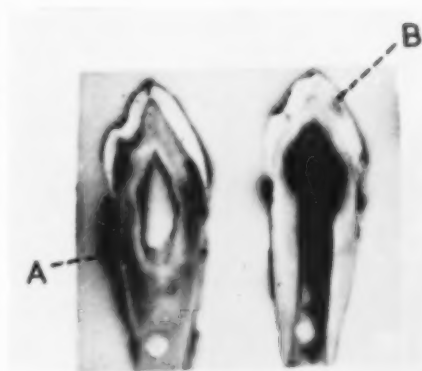


FIG. 2. Serial autoradiographs of an attrited incisor of a man, aged 20, of which the crown had been immersed for 4 weeks in C^{14} labelled glucose solution. $\times 2$.

"A" Halo of exposed film produced by electron scatter.

"B" Artefact in autoradiograph.

"C" Marked radio-activity along line of interglobular dentine.

"D" "Calcific" barrier showing no radio-activity around dead tract below the attrited biting edge of tooth.

"E" Early carious lesion, not clinically recognizable.

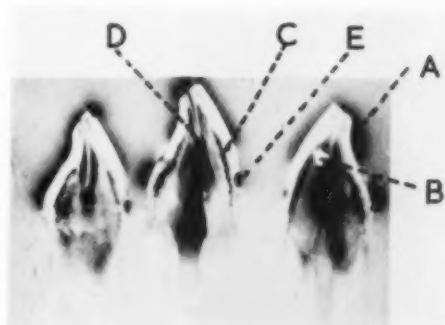


FIG. 3. Serial autoradiographs of an attrited incisor of a male patient, aged 20, of which the crown had been immersed for 10 weeks in C^{14} labelled glucose solution. $\times 2$.

"A" Dead tract within dentine lying below apparently sound enamel with some cracks in its structure. Note the low radio-activity within this area.

"B" "Calcific" barrier showing no radio-activity around dead tract below exposed dentine at the tip of the tooth. Note the low radio-activity of dead tract.

"C" Radio-activity within an early carious lesion which had not been detectable clinically.

"D" Apparent radio-activity within sound enamel. This may have been produced by electrons from the underlying surface of the enamel penetrating to the photographic plate through the very thin enamel of this last serial section.

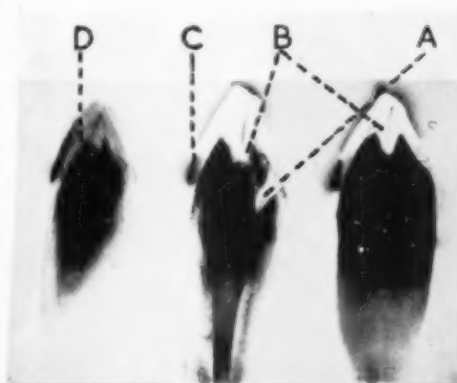


FIG. 4. Serial autoradiographs of a heavily attrited tooth of a man, aged 52, after immersion of the crown for 16 days in C^{14} labelled glucose solution. $\times 1\frac{1}{2}$.

"A" Radio-activity within very early carious interstitial lesions. One of these had not been detected clinically. The radio-activity extends throughout the full area of the carious lesions.

"B" Low radio-activity in the "calcific" barrier below carious lesion.

Note the low radio-activity in most of the dentine below the attrited surface.

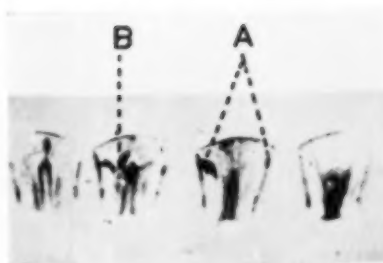


FIG. 5. Serial autoradiographs of a premolar tooth of a girl, aged 18, after 9 days immersion of the crown in C^{14} labelled glucose solution. $\times 2$.

A carious lesion was present on the occlusal surface (B) but the early carious interstitial lesions (A) had not been detected clinically. Note that marked radio-activity is present throughout the full extent of the carious lesion.



DÉTECTION ET LOCALISATION DES PROTIDES SULFHYDRILÉS AU COURS DE L'ODONTOGÉNÈSE CHEZ LE RAT BLANC

R. WEILL

Laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine et Ecole Odontologique de Paris

Résumé—Nous avons utilisé la méthode de Barnett et Seligman pour détecter et localiser les protides sulfhydrilés au cours de l'odontogénèse chez le rat blanc. Nos recherches ont porté sur l'évolution du germe dentaire entre le dix septième jour *in utero* et le cinquième jour postnatal. Les groupements SH et SS ont été localisés dans les cellules actives et dans le préémail, l'émail jeune et une couche adamantine à la jonction adamantodentinaire. Quelques précisions ont pu être apportées au sujet de l'adamantogénèse.

Abstract—The methods of Barnett and Seligman were used to localize the protein-bound sulphhydryl and disulphide groups during odontogenesis in the rat. This investigation starts at the seventeenth day *in utero* and continues to the fifth day of life. The sulphhydryl and disulphide groups are present within the cells, particularly in the nuclei. The cytoplasm becomes slowly enriched until it is heavily charged just before the genesis of dentine and enamel matrix. These proteins are not incorporated into the dentine matrix although they are present in the odontoblast processes. They are, however, incorporated into the enamel matrix. It appears that they migrate from the stratum intermedium to the ameloblasts. Thence they are excreted into the pre-enamel where they form the lining of the matrix globules and also a core in their centre. In young enamel, the staining is heavier and suggests the formation of a sheath. In older enamel, the stain disappears but a positive reaction remains at the dentino-enamel junction. It has been shown that methionine labelled with S^{35} is retained in older enamel. Thus, the absence of staining at level at which S^{35} , originating from labelled methionine, is still present suggests that a biochemical molecular change in the matrix may have taken place. The linked sulphhydryl and disulphide groups take part in the metabolic activity of active cells and form part of the structural proteins of the enamel matrix.

Zusammenfassung—Durch Anwendung der Methode von Barnett und Seligman versuchten wir bei Ratten im Bereiche der Zahnkeime Sulfhydryl- und Disulfid-Gruppen, die an Proteine gebunden sind, zu lokalisieren. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich vom 17. Tag *in utero* bis zum 5. Lebenstag. Die erwähnten Gruppen waren in den Zellen und besonders im Zellkern nachzuweisen. Das Zytoplasma enthält sie nur spärlich, wird mit diesen Gruppen aber unmittelbar vor der Bildung der Dentin- und Schmelzmatrix stark angereichert. Die genannten Proteine werden nicht in die Dentinmatrix eingebaut, sind aber in den Odontoblastenfortsätzen zu erkennen. Andererseits sind sie auch in der Schmelzmatrix zu finden. Diese Substanzen scheinen von den Zellen des Stratum intermedium zu den Ameloblasten zu wandern. Sie werden in den Prä-Schmelz eingeschleust, um eine Abgrenzung für die Matrix-Globuli und Kerne im Innern dieser Strukturen zu bilden. Im jungen Schmelz ist die Färbung stärker und zeigt hier jeweils die Bildung einer Scheide an. In reiferem Schmelz verschwindet die Färbung; eine positive Reaktion im Schmelz bleibt jedoch an der Schmelz-Dentingrenze sichtbar. Wir erinnern in diesem Zusammenhang an

die Beobachtung, dass S^{35} -markiertes Methionin in reifem Schmelz vorhanden ist und dass somit das Verschwinden der Färbung an den Stellen, wo S^{35} von markiertem Methionin noch festgestellt wurde, auf die Möglichkeit einer biochemischen molekularen Veränderung der Matrix hinweist. Die an Protein gebundenen Sulfhydryl- und Disulfid-Gruppen sind die stoffwechselaktiven Elemente in den Zellen und gehören zu den Strukturproteinen der Schmelzmatrix.

INTRODUCTION

LES RÉACTIONS générales des protides ne nous ont donné que peu de résultats dans l'étude des tissus dentaires sains et cariés. Il y avait évidemment lieu de compléter ces données par la mise en oeuvre des techniques de détection des protides sulfhydrylés. On sait, en effet, que les protides sulfhydrylés jouent un rôle considérable dans l'édification de ce qu'on appelle aujourd'hui protéines de structure.

On sait, par ailleurs, grâce aux recherches inaugurées par GIROUD et BULLIARD (1930) déceler les protides sulfhydrylés à l'échelle cellulaire au moyen de réactions histochimiques qui ont été perfectionnées progressivement et qui atteignent à l'heure actuelle un haut degré de sensibilité et de spécificité chimique. WISLOCKI et SOGNAES (1950) et NAUJOCKS (1956) ont utilisée la réaction de Chèvremont et Frédéric; JOHNSON et BEVELANDER (1954), SOGNAES (1955) et FULLMER (1958) celle de Barnett et Seligman pour mettre en évidence ces protides dans les tissus dentaires. Ils ont observé des réactions positives dans les odontoblastes et la prédentine, à la jonction prédentine dentine, dans le préemail et les adamantoblastes. La méthode au ferriocyanure ferrique qui est, rappelons-le, une réaction générale des composés réducteurs donne dans certains cas des préparations où le contraste entre les zones positives et le fond est trop peu marqué pour que l'on puisse affirmer la présence de faibles quantités de protides sulfhydrylés. La technique de Barnett et Seligman, utilisant le D.D.D. (6,6 disulfure de 2,2 dihydroxy-dinaphtyle) et le fast red salt B donne des préparations plus univoques.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Nous avons suivi les localisations de ces groupements dans le cycle de l'odontogénèse chez le rat blanc. Les prélèvements couvrent jour par jour une période allant du dix-septième jour *in utero* au cinquième jour après la naissance. Les pièces ont été fixées au liquide de Bouin, incluses dans la paraffine et débitées en coupes sérieées de 5 μ .

Etant donnée la chronologie d'apparition des germes dentaires, nous avons pu observer l'évolution de la lame dentaire au cours de l'histogénèse et l'élaboration de la dentine et de l'email. Ainsi nous groupons nos observations en deux chapitres, l'un portant sur l'histogénèse et l'autre sur la dentino- et l'adamantogénèse.

RÉSULTATS

Au cours des premières phases du développement du germe dentaire les groupements SH sont localisés exclusivement dans le noyau. Le nucléole est intensément coloré en rouge, ainsi que les figures chromosomiques au cours des mitoses. Le

cytoplasme est pâle; une basale faiblement positive sépare l'épithélium du mésenchyme ambiant. Au stade de la cloche, le cytoplasme s'est légèrement enrichi surtout dans le stratum intermedium et les adamantoblastes. Le reticulum étoilé présente des filaments et des amas extracellulaires positifs. Dans la papille dentaire, si la coloration peut paraître à faible grossissement plus nette, c'est que les cellules se sont multipliées et entassées. Le cytoplasme des cellules périphériques est plus riche. La substance fondamentale reste incolore. Les localisations des groupements SS sont identiques encore que la coloration soit plus pâle.

La mise en route des processus d'élaboration matricielle est annoncée par un enrichissement en groupements SH et SS soudain et strictement localisé aux zones actives du germe. Les odontoblastes et les cellules de la couche sous-jacente, le stratum intermedium et les adamantoblastes sont affectés par ce processus. Ainsi, dans le germe de la première molaire, l'élaboration de la dentine et de l'émail commencent au niveau d'un flanc cuspidien et les protides sulfhydrilés de ces cellules augmentent nettement avant l'élaboration dont la phase est ainsi annoncée.

L'odontoblaste fonctionnel a un cytoplasme très chargé. De même la fibre de Tomes présente une réaction fortement positive. La pré-dentine et la dentine sont très pâles. Il ne semble pas qu'au cours de la dentinogénèse les protides sulfhydrilés soient inclus dans la matrice dentinaire. La réaction de Barnett et Seligman donne des renseignements très féconds sur l'adamantogénèse. Ceci avait été noté par les auteurs précités.

Le stratum intermedium s'est enrichi notablement et on observe des amas positifs extracellulaires entre les cellules de cette assise et la base des adamantoblastes. Il est possible qu'il y ait échange de matériaux riches en groupements SH et SS entre ces deux couches cellulaires. L'adamantoblaste a un noyau très positif, des cadres cellulaires aux deux pôles. Le cytoplasme présente des amas très colorés, donnant l'apparence d'une fibrillation longitudinale. La couche adamantine présente une limite nette. La méthode de Barnett et Seligman ne met pas en évidence de prolongement de Tomes ou d'appareil ciliaire. Des amas granuleux ou bien des globules positifs se dessinent dans le cytoplasme apical. A la limite des adamantoblastes une matrice sécrétée, finement granuleuse, riche en protides sulfhydrilés dessine des figures polygonales comme si la sécrétion était guidée par le cadre cellulaire. D'emblée la morphologie du prisme s'établit. La zone dite d'homogénéisation d'où émergeraient les gaines des prismes, et que décrivent les classiques n'a pu être mise en évidence. La structuration prismatique est immédiate. Les aires centrales de ces polygones ne sont pas colorées et portent en leur milieu un gros grain coloré. Ce grain disparaît dès que la matrice, de par l'apposition d'une nouvelle couche aura migré un peu plus loin des cellules et sa disparition coïncidera avec un enrichissement intense de la matrice pariétale. On peut donc distinguer entre préémail et émail jeune. Le premier se présentant à la limite de la cellule avec une paroi positive et un grain central, le second lui succède dans le temps et dans l'espace et se manifeste par la disparition du grain central et une accentuation de la colorabilité pariétale. La gaine du prisme s'individualise à ce niveau. En coupe légèrement oblique l'émail jeune a une épaisseur de 2 à 3 mus. Le rasoir du microtome taille les cordons

adamantins en biseau et provoque cette apparence de boîtes contiguës décrites par GUSTAFSON (1959). Jusqu'à présent aucune technique de coloration n'a pu différencier la masse centrale des prismes et la caractériser. La gaine seule prend le colorant. D'où l'image des ces boîtes. En s'éloignant encore des adamantoblastes, la matrice se décolore et devient plus homogène; la structure en gaine tend à disparaître. A partir du troisième jour, sur la première molaire et l'incisive, l'émail, au delà des couches jeunes et constamment renouvelées se décolore totalement. Cependant à la jonction adamantine dentinaire subsiste une bordure d'émail intensément colorée par le fast red salt B. Nous l'avons constamment observée jusqu'au cinquième jour. Il se peut que cette couche subsiste indéfiniment.

En coupe presque transversale de l'émail de l'incisive on met en évidence en quelque sorte un étalement des couches de préémail et d'émail jeune. Dans le préémail on observe une véritable structure en nid d'abeilles, des polygones assez réguliers portant le globule central. Dans l'émail jeune ces figures se sont déformées et aplaties. Des bandes régulières faites de globules empilés alternent avec des bandes homogènes. Cependant en variant la mise au point du microscope, on peut inverser cet aspect. Il semble que la coupe passe au centre de certains prismes et sur la paroi des autres. La sécrétion adamantine se ferait donc rythmiquement par unités globulaires. Les protides sulfhydrilés de la matrice seraient répartis à la périphérie. La recherche des protides disulfurés donne des localisations identiques et une répartition d'intensité semblable. Cependant, comme nous l'avons déjà remarqué, l'intensité de la coloration est plus faible que pour les groupements SH.

DISCUSSION

Nous confirmons en grande partie les résultats des auteurs précédemment cités. Mais nous apportons en outre quelques notions à retenir. Nous avons signalé l'augmentation subite et importante des protides sulfhydrilés et disulfure dans les couches cellulaires génératrices au moment où débute leur fonction élaboratrice. Cette augmentation peut traduire, soit l'intervention directe des protides sulfhydrilés dans l'édification des matériaux élaborés par les cellules en question, soit aussi l'accroissement d'activité métabolique. Il semble que les protides sulfhydrilés interviennent dans le métabolisme cellulaire des odontoblastes et ne participent pas aux matériaux élaborés. Dans l'organe adamantin ils accomplissent le même rôle et de plus sont intégrés dans les protides de structure de la matrice adamantine.

Il est bien clair que ce travail n'apporte de données histochimiques que sur la destinée d'un seul des composants d'une matrice adamantine vraisemblablement plus complexe. Il serait donc absolument illogique de notre part de déduire de cette étude unilatérale des conclusions définitives sur l'adamantogénèse. Certaines observations confirment les opinions professées par A. G. GUSTAFSON. La sécrétion adamantine s'organiserait par un processus physico-chimique. La sécrétion adamantine contient donc des protides sulfhydrilés qui au cours de l'élaboration se répartissent sur le pourtour des géodes primitives du préémail. L'enrichissement de ces parois se fait par l'apport du globule central SH et SS positif. Nous ne savons rien de la nature de la substance centrale incolore et nous ne savons pas pourquoi les matériaux

protidiques migrent vers la périphérie. Alors que dans le préemail nous pouvons observer des éléments séparés sans gaine continue, nous voyons celle-ci apparaître dans l'email jeune après l'enrichissement pariétal en protides sulfhydrilés. Nous sommes donc d'accord avec A. G. GUSTAFSON quant à la chronologie du phénomène. Du fait de la décoloration de l'email plus âgé, cette méthode ne met pas en évidence de striation transversale.

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus avec la méthode de Barnett et Seligman et ceux que nous avons observés par l'histoautoradiographie de germes dentaires avec la 35 S méthionine (WEILL et BESCOL-LIVERSAC, 1959). En ce qui concerne la dentinogénèse, nous signalions la richesse en isotopes des cellules actives et la pauvreté relative de la matrice où seuls les trajets des fibres de Tomes semblaient véhiculer l'élément marqué. Pour l'organe de l'email il y a identité entre les résultats des colorations et celles des histoautoradiographies. Ils suggèrent un apport en matériaux SH et SS positifs du stratum intermedium vers les adamantoblastes. Dans l'email le soufre marqué ne disparaît pas. Si la bande noire semble s'affaiblir, cela peut être dû à une perte d'activité de l'isotope. Cette bande marquée s'éloigne régulièrement des adamantoblastes du fait de l'apposition de nouvelles couches et subsiste dans l'email plus vieux, celui-même qui est décoloré sur coupes traitées par la méthode de Barnett et Seligman. Cette observation suggère l'idée d'un remaniement chimique moléculaire dans la matrice au moment de la minéralisation. La richesse de l'email jeune et la persistance d'un email positif à la jonction adamantodentinaire pourraient nous faire penser que ces protides ne subsistent qu'à proximité d'éléments cytoplasmiques riches, en l'occurrence les adamantoblastes et les fibres odontoblastiques de Tomes.

Ainsi se trouve une fois de plus démontrée la nécessité d'utiliser des techniques histochimiques différentes mais convergentes.

CONCLUSIONS

La technique de Barnett et Seligman utilisée pour l'étude des protides sulfhydrilés au cours de l'odontogénèse chez le rat blanc nous a permis de mettre en évidence:

- (1°) la présence de protides sulfhydrilés et disulfure dans le cytoplasme des cellules actives au cours de l'odontogénèse;
- (2°) l'enrichissement de leur cytoplasme en groupements SH et SS au moment où va commencer la sécrétion matricielle;
- (3°) l'absence de ces substances de la préentine et de la dentine;
- (4°) la possibilité d'un apport du stratum intermedium vers les adamantoblastes;
- (5°) leur présence dans le préemail et l'email jeune due à la sécrétion adamantoblastique;
- (6°) la disparition de la réaction dans l'email plus ancien sauf à la jonction adamantodentinaire;
- (7°) le rôle de structure matricielle de ces protides au cours de l'adamantogénèse et la précocité morphologique de la matrice adamantine dès le départ de l'adamantoblaste.

RÉFÉRENCES

- FULLMER, H. S. 1958. Histochemical protein reactions in human developing teeth. *Lab. Invest.* **7**, 48-51.
- GIROUD, A. et BULLIARD, H. 1930. Recherches sur la kératinisation de l'épiderme et des phaneres. *Arch. Morph. gén. exp.* **29**, 78 pp.
- GUSTAFSON, A. G. 1959. A morphologic investigation of certain variations in the structure and mineralization of human dental enamel. Thèse, Malmö. *Odont. Tidskr.* **67**, 361-472.
- JOHNSON, P. L. et BEVELANDER, J. 1954. The localisation and interrelation of nucleic acids and alkaline phosphatase in the developing teeth. *J. dent. Res.* **33**, 128-135.
- NAUJOKS, R. 1956. Histotopochemische Untersuchungen am Zahnorgan. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* **24**, 265-312.
- SOGINNAES, R. F. 1955. Microstructure and histochemical characteristics of the mineralized tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **60**, 545-572.
- WEILL, R. et BESCOL-LIVERSAC, J. 1959. Assimilation par l'organe dentaire de méthionine marquée au soufre 35. *J. dent. belge* **1**, 68-74.
- WISLOCKI, G. B. et SOGINNAES, R. F. 1950. Histochemical reactions of normal teeth. *Amer. J. Anat.* **87**, 239-276.

FIG. 1. Richesse du cytoplasme des cellules élaboratrices au moment où a commencé la dentinogénèse et va débiter l'adamantogénèse. Molaire de rat $\times 90$.

FIG. 2. A plus fort grossissement on observe les amas du reticulum étoilé, la richesse du stratum intermedium, des adamantoblastes, des fibres de Tomes, des odontoblastes et des cellules sous-jacentes. $\times 560$.

FIG. 3. Aspect général. On remarquera les cadres cellulaires des adamantoblastes et les deux couches colorées de l'émail séparées par une bande décolorée. $\times 90$.

FIG. 4. Les géodes du préemail avec leurs globules. Vacuoles de sécrétion dans les adamantoblastes. $\times 1400$.

FIG. 5. Les globules de sécrétion des adamantoblastes; le préemail présente ses polygones avec leur globule central; bande décolorée entre l'émail jeune et l'émail de la jonction. $\times 1400$.

FIG. 6. Coupe presque transversale avec étalement des couches. On y observe les géodes polygonales avec le globule central qui disparaît avec l'enrichissement pariétal de l'émail jeune. Les gaines se constituent à ce niveau. $\times 1400$.

DÉTECTION ET LOCALISATION DES PROTIDES SULFHYDRILÉS

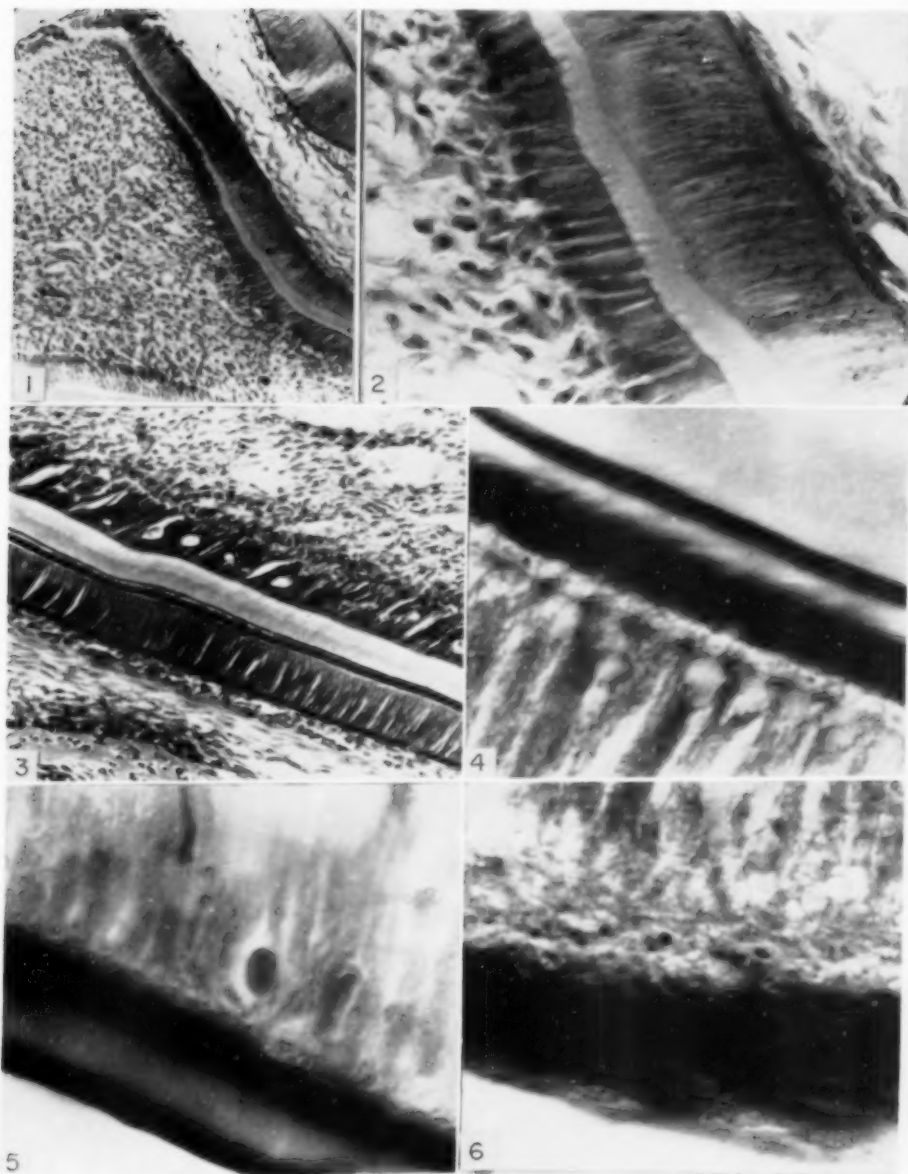


PLANCHE I

248 (25)

Vol.
4
1961

LES STRUCTURES ORGANIQUES DE L'ÉMAIL ET LES THÉORIES PROTÉOLYTIQUES DES CARIES

B. KEREBEL

Ecole Odontologique de Paris

Résumé—La protéolyse dans les caries de l'émail est très vraisemblable bien que l'importance du processus de déminéralisation soit bien établie. Les énormes difficultés de l'analyse chimique de la trame organique de l'émail expliquent notre ignorance du moment précis auquel se produit la protéolyse.

Abstract—It seems very likely that proteolysis takes place during enamel caries although the importance of demineralization has been well established. The enormous difficulty of analysing chemically the organic matrix of the enamel explains our ignorance of the precise stage at which proteolysis takes place.

Zusammenfassung—Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei der Schmelzkaries eine Proteolyse sehr wahrscheinlich stattfindet; die Bedeutung der Demineralisationsvorgänge dürfte dagegen als gesichert gelten. Die grossen Schwierigkeiten bei der chemischen Analyse der organischen Anteile des Schmelzes erklären unsere augenblicklichen geringen Kenntnisse über die Proteolyse.

LES THÉORIES PROTÉOLYTIQUES des caries qui datent de plus d'un demi-siècle sont mentionnées ou discutées dans des revues générales récentes (10, 32, 51, 105, 115). Elles doivent être étudiées en fonction de nos connaissances actuelles de l'histologie et de la chimie de l'émail;

L'interprétation classique de la structure prismatique de l'émail vient d'être remise en question (70-74, 101, 102). On sait que la substance interprismatique n'est pas décelable à tous les niveaux de l'émail humain étudié au microscope optique. Or des images de microscopie électronique montrent incontestablement des prismes juxtaposés (14, 70-74) sans substance interprismatique et des adamantoblastes directement accolés. Ces images ont incité HELMCKE à soutenir l'opinion que la structure prismatique de l'émail est un artefact.

Du fait que la structure prismatique de l'émail est observée par les méthodes convergentes d'examen en microscopie optique (62, 127) et en microscopie électronique (48, 49, 89, 90, 102, 106, 128, 129, 131, 133, 163, 164, 166) il semble que la discussion de la structure prismatique soit un pseudo-problème comme il en existe en histologie dentaire. En effet, l'unité morphologique de l'émail des mammifères est bien le "prisme" qui est repérable à l'ultrapak comme sur les coupes préparées par usure ou débitées au microtome—et c'est nier l'évidence ou méconnaître l'histologie comparée, pourtant bien étudiée aujourd'hui (127, 142), que ne pas l'admettre. Cependant, l'unité biologique de l'émail n'est pas le prisme et c'est en cela que la

critique de HELMCKE est constructive. Dans le domaine sub-microscopique au niveau duquel s'effectuent le métabolisme et les dégradations pathologiques, l'émail n'est que l'intrication complexe de fibrilles organiques et de microcristaux minéraux: l'apparence optique et électronique des gaines est due au pourcentage plus élevé des fibrilles à ce niveau, tandis que dans le corps du prisme ce sont les éléments minéraux submicroscopiques qui dominent. Donc si le problème de la carie de l'émail se passe réellement au delà du microscope, il est évident que l'interprétation classique de la structure prismatique de l'émail est sinon fausse, du moins insuffisante.

La connaissance de la structure de l'émail s'est donc compliquée—et il est devenu impossible de se contenter aujourd'hui des résultats d'un seul moyen d'investigation.

Négligée dans le passé, la fine trame organique de l'émail est mise en évidence aujourd'hui par tous les histologistes. En poids cette matrice est en effet négligeable mais en volume elle est égale à la substance minérale comme l'avait indiqué le premier BODECKER (20). La décalcification ménagée de l'émail prouve que la surface primitivement occupée par l'émail mature est entièrement couverte par la substance organique sur les coupes.

La décalcification à vue révèle dans l'émail la présence de tractus organiques quantitativement plus importants que les gaines des prismes; ce sont les lamelles. Leur recherche systématique montre qu'elles sont plus nombreuses qu'on ne l'indiquait auparavant (91, 92) (Figs. 1 et 2). Leur nature sur laquelle on a longtemps discuté (92) a été récemment précisée par des études au microscope optique (76-78) et surtout au microscope électronique (3-6). Elles sont tantôt constituées par la gaine des prismes, tantôt par la substance du corps du prisme (Fig. 3).

La trame organique insoluble de l'émail mature est constituée dans l'ordre de grandeur décroissante par la cuticule, par les lamelles et par les gaines des prismes. Autrement dit, la substance organique prédomine au niveau de la cuticule et des lamelles. La masse organique totale de l'émail mature ne dépasse pas 3p 100; la fraction la plus dense de l'émail renferme 0,27p 100 de matériel organique; la moins dense 2,3p 100 (22). La protéine totale de l'émail est évaluée à 0,5p 100 de la masse organique (104, 150, 152): il semble que la presque totalité de la protéine soit une kératine insoluble mais il existe une fraction protéinique soluble, une glycoprotéine (0,17p 100), des peptides (0,15p 100), de l'acide citrique (0,10p 100).

La protéine insoluble de l'émail est une "eukératine" qui possède une faible solubilité et renferme de l'histidine, de la lysine et de l'arginine. Cependant elle n'offre pas une grande résistance aux enzymes, possède des taux peu élevés d'acides soufrés et une hydroxyproline suggérant l'existence de collagène (153). Les composés collagènes des protéines solubles et insolubles de l'émail sont généralement considérés comme des impuretés provenant des fragments de dentine adhérents aux échantillons d'émail ou encore des fuseaux de l'émail; toutefois ces composés existent encore dans l'émail purifié (152).

Les quelques résultats de l'histochimie de l'émail (144a) sont sujets à des réserves. Ainsi l'imprécision des notions de métachromasie du "pourtour des prismes" s'accuse encore si l'on souligne la confusion fréquente entre gaines et substance interprismatique que peut seul éviter dans certains cas le microscope polarisant. De plus les

LES STRUCTURES ORGANIQUES DE L'ÉMAIL

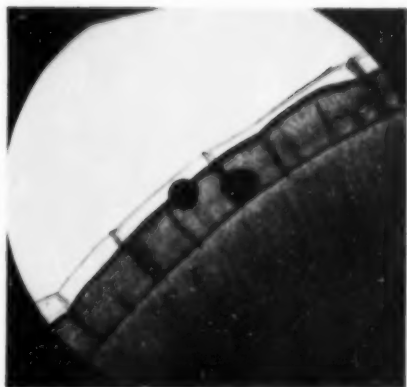
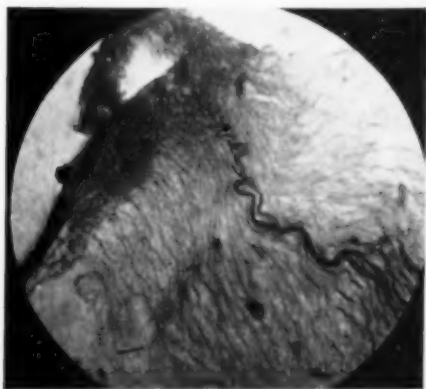


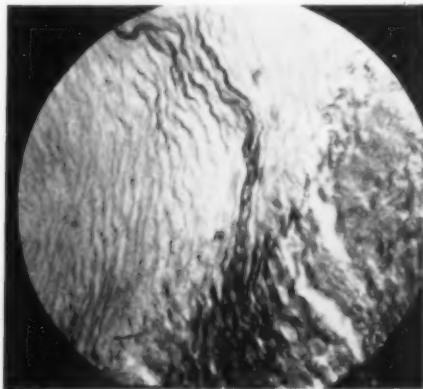
FIG. 1. Coupe horizontale par usure, décalcifiée à vue. Lamelles de l'émail.



FIG. 2. Coupe horizontale par usure, décalcifiée à vue. Lamelles de l'émail.

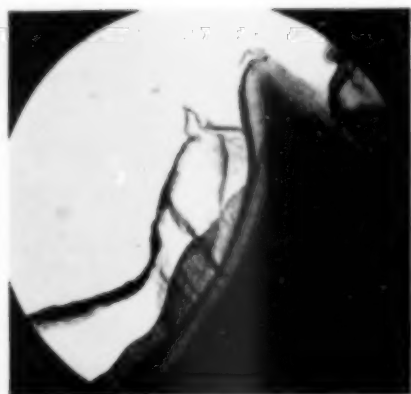


(a)



(b)

FIG. 3. Coupe décalcifiée. Hém. Eosine. Trame organique de l'émail.



(a)



(b)

FIG. 4. Coupe longitudinale par usure, décalcifiée à vue. La cuticule, des lamelles, une partie de la trame organique et la ligne néo-natale ont résisté à la décalcification.

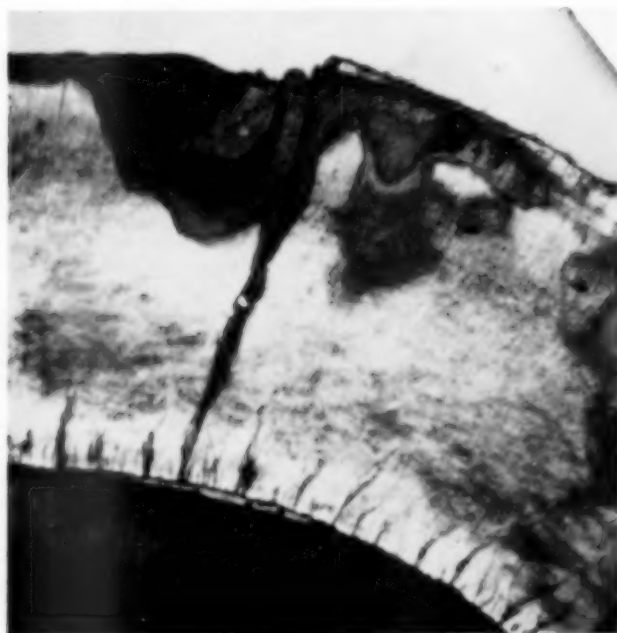


FIG. 5. Coupe horizontale par usure. Imbibition: acetone. Lumière polarisée, nicols croisés. Zone positive le long d'une lamelle.

LES STRUCTURES ORGANIQUES DE L'ÉMAIL

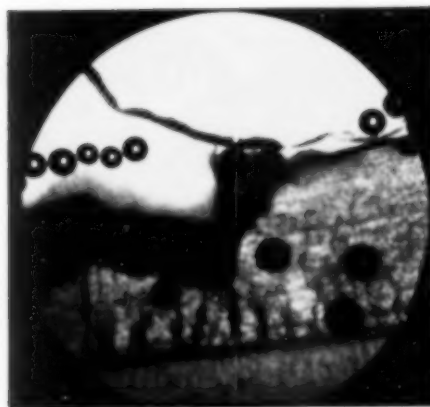


(a)

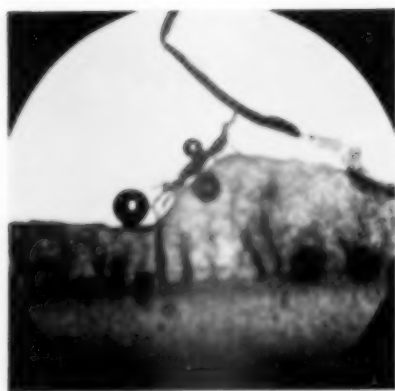


(b)

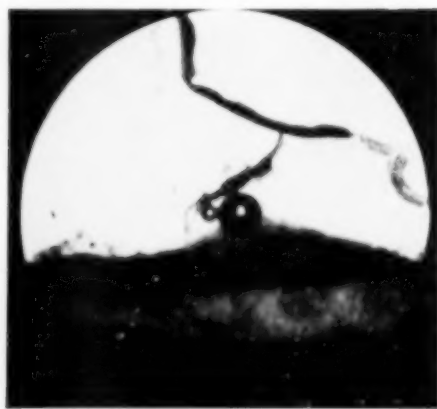
FIG. 6. Coupe longitudinale par usure. Imbibition: baume de Canada. Lumière polarisée, nicols croisés. Lésion progressant le long des stries de Retzius.



(a)



(b)



(c)

FIG. 7. Coupe par usure à différents stades de la décalcification à vue. La lamelle est intacte au sein de la carie de l'émail.

gaines auxquelles on attribue de la métachromasie ne sont en réalité distinctes que par leur pourcentage légèrement plus élevé en substance organique; il s'agit d'une différence de degré et non de nature.

Aussi n'est-il pas surprenant que la question de savoir à quelle structure particulière correspondent respectivement la fraction organique soluble et la fraction organique insoluble de l'émail n'ait pas encore reçu de réponse satisfaisante. Sur le plan histologique il semble que la solubilité ou l'insolubilité de certaines structures organiques ne dépendent pas seulement d'un facteur qualitatif mais aussi quantitatif; ce n'est pas seul le degré de kératinisation de la matrice organique qui conditionne son insolubilité, c'est aussi son volume. L'épaississement des gaines au niveau des stries de Retzius peut ainsi expliquer que certaines de ces stries résistent sur les coupes d'émail décalcifié où elles subsistent avec la cuticule et les lamelles. C'est sans doute leur relative importance quantitative qui explique la résistance sur les coupes décalcifiées de la strie de Retzius la plus importante, la ligne néo-natale (Fig. 4). Compte tenu du fait que la carie débute à la surface de l'émail, l'étude de cette surface prend une importance considérable (1, 2, 13, 42, 60, 61).

La structure submicroscopique de l'émail plus que les connaissances histologiques classiques d'une part, la connaissance fragmentaire de la chimie de l'émail d'autre part, conditionnent les hypothèses relatives à sa destruction par la carie. L'examen des théories protéolytiques des caries de l'émail sera maintenant entrepris en fonction de ces connaissances.

I. LES ARGUMENTS EN FAVEUR DE LA CARIE—PROTÉOLYSE DE L'ÉMAIL

L'explication de la destruction de l'émail par l'attaque acide est parfois tenue pour insuffisante parce qu'ainsi le comportement de la trame organique n'est pas expliqué, d'où une tendance à invoquer la protéolyse dans le processus carieux. Les arguments sont surtout fournis par analogie avec les phénomènes protéolytiques observés au sein de la dentine cariée. C'est MILLER lui-même (108) qui a montré que la dentine décalcifiée est détruite par les bactéries protéolytiques.

Du fait que la trame de l'émail est principalement constituée par une kératine, celle-ci doit être détruite par les enzymes élaborés par des organismes protéolytiques. Mais il reste pour l'instant à faire la preuve de l'existence de microorganismes de la flore buccale capables de provoquer la destruction enzymatique de la kératine.

En plus de la kératine il existe dans l'émail mature une glycoprotéine (1p 100) beaucoup plus soluble et beaucoup moins résistante à la protéolyse; un mucopolysaccharide acide est normalement présent au niveau des gaines des prismes (40, 147). Dans un émail mal minéralisé ou un émail partiellement déminéralisé, une dépolymérisation du mucopolysaccharide acide qui entoure les prismes est théoriquement possible (147). La sulfatase extraite d'un organisme gram négatif pourrait réaliser cette dépolymérisation (119-122). Cependant, jusqu'à présent, la démonstration histochimique de sulfatase au niveau des lésions dentaires n'a pas été faite (145). Un certain nombre de modifications pathologiques ont été cependant observées dans les stades précoces des caries de l'émail dont une augmentation de la perméabilité,

une dépolymérisation des mucopolysaccharides évoquant des modifications produites par l'hyaluronidase (155). Une antihyaluronidase administrée aux rats recevant un régime cariogène a diminué de façon notable les caries. Aussi le rôle possible d'une hyaluronidase d'origine bactérienne dans le déclenchement des caries a-t-il été invoqué (154).

L'existence (à dose très faible) de collagène dans l'émail incite à rappeler que 102 organismes isolés dans les foyers de caries sont capables de jouer un rôle dans la protéolyse du collagène (125). Les tissus dentaires préalablement déminéralisés sont la proie de la protéolyse par une collagénase extraite de *Clostridium Welchi* (41), par des enzymes extraits de *Clostridium histolyticum* (44), par la trypsine (34). Toutefois ces découvertes sont sans conteste infiniment plus importantes dans la destruction de la dentine que dans celle de l'émail. Et en ce qui concerne l'émail, la carie "maladie du collagène" (30) est une hypothèse sans fondement.

Certain microorganismes sont capables d'attaquer l'émail *in vitro*. Des lactobacilles, des streptocoques alpha et des actinomycètes ont produit à pH neutre *in vitro*, des lésions comparables en partie à des caries (81-83). En réalité il s'agit ici d'un processus un peu particulier: le passage des bactéries dans l'émail immature des dents de Hamster. Les changements observés *in vitro* au niveau de cette trame sont donc différents des caries.

Il est un fait que les coupes soigneusement décalcifiées conservent parfois la plaque bactérienne dans ses rapports avec la trame même de l'émail (21, 52-54, 105). Que ces images soient celles de caries véritables est très vraisemblable mais il est plus difficile d'affirmer qu'il s'agisse là d'un stade précoce du processus comme le prétendent parfois les auteurs (52-54). En effet, cette technique de préparation histologique élimine tout le substratum minéral et ne permet qu'une observation partielle donc des conclusions limitées; en particulier, non seulement cette méthode ne renseigne nullement sur une antériorité de la protéolyse par rapport à la décalcification mais elle ne fait pas même la preuve de la protéolyse. La préparation de répliques et surtout de coupes ultra fines au microscope électronique est à cet égard plus convaincante (14, 49, 107, 130, 162, 165) surtout lorsque les coupes sont réalisées sans décalcification préalable. Il ressort en effet de ces observations que le réseau organique intact ne laisse pas passer les bactéries dans l'émail et que l'invasion bactérienne et l'occupation des loges de l'émail sont précédées par une attaque de la fraction minérale, par une décalcification; ces observations ne permettent de préjuger en rien de l'état de la trame organique.

Les lamelles de l'émail sont des voies de pénétration possible sans destruction tissulaire préalable. Les caries propagées par des lamelles de l'émail ont été très souvent observées (8, 21, 51-54, 55-59, 93, 94, 97, 100, 115, 116, 124). Ces caries ont pu être considérées comme une protéolyse vraie (68). Il arrive qu'une lamelle examinée en lumière polarisée coïncide précisément avec une zone de biréfringence positive qu'elle conduit vers la dentine (93) (Fig. 5); cette zone peut être constituée par de l'émail déminéralisé dont la trame est dépolymérisée. Lorsque cette zone positive manque, il existe des cas indiscutables de lésions protéolytiques conduites par une lamelle, ce sont des lésions dentinaires, tache jaune sous la jonction émail-dentine

ou lésion de la jonction émail-dentine. Cependant d'une part, ces cas ne peuvent être considérés comme les caries les plus habituelles et d'autre part, les caries de la jonction émail-ivoire qui semblent des lésions protéolytiques succèdent souvent à une déminéralisation initiale de l'émail. Enfin, la pigmentation jaune significative de la protéolyse (63) pourrait aussi provenir d'une réaction chimique entre la dégradation des glucides et des amino-acides ou des protéines de la dent elle-même (38, 39). Donc si la protéolyse est incontestable dans ces lésions, elle accompagne et surtout succède au processus de déminéralisation.

Une opinion classique veut que le processus carieux s'attaque d'abord à la substance interprismatique (100). Ce dogme repose en fait sur l'examen routinier de coupes préparées par usure, en lumière ordinaire et il est guidé par l'idée erronée que l'unité anatomique de l'émail le prisme, en est aussi l'unité biologique. Or, pour faire une distinction valable entre gaines et substance interprismatique sur des préparations par usure il est indispensable d'examiner en lumière polarisée des coupes fines parallèles au grand axe des prismes, les examens routiniers étant sans valeur. Le microscope électronique montre d'ailleurs que le processus carieux peut se propager tantôt le long des gaines tantôt le long de la substance interprismatique (130) ce qui n'est nullement surprenant si l'on sait que le prisme n'est pas l'unité biologique de l'émail. Si, sous de sérieuses réserves, certaines expériences de perméabilité sont assimilables au processus carieux (ainsi les zones d'émail où la proportion de substance organique domine), si d'autre part on tient compte de certains résultats d'examen en lumière polarisée (36, 37, 63, 84, 92, 160, 161), il est possible d'admettre que le processus carieux se fasse effectivement le long des gaines et des stries de Retzius, argument en faveur d'une protéolyse (Fig. 6) qu'il débute à la surface de l'émail par la terminaison des stries de Retzius (37), autre argument en faveur de la protéolyse.

La pénétration du nitrate d'argent dans l'émail a souvent été identifiée à la carie protéolytique (63); le NO_3Ag *in vivo* et *in vitro* peut se déposer en effet le long de certaines voies organiques (lamelles, gaines). Mais c'est faire une analogie très superficielle que confondre absolument avec une protéolyse ce cheminement qui paraît aussi rappeler un processus de déminéralisation et c'est identifier sans preuve les caries à un grossier phénomène de perméabilité. Car le dépôt d'argent le long de certaines structures de l'émail ne saurait prétendre à des résultats aussi précis que le passage des petites molécules de corps marqués. Or les isotopes radioactifs qui permettent pourtant de faire de fines différences entre le passage par voie interne et par voie externe (145-146) ne peuvent donner d'indication sur la perméabilité de telle ou telle microstructure. Les grosses lamelles de l'émail peuvent aisément être imprégnées par le nitrate d'argent et rester identifiables au microscope optique après décalcification à vue des coupes préparées par usure (93, 94) mais dans ces observations la part de la protéolyse n'est nullement précisée. Pour toutes ces raisons l'analogie entre passage du NO_3Ag et protéolyse devrait être abandonnée.

La nécessité de la protéolyse dans la carie de l'émail semble découler des observations faites sur la cuticule. En effet, la décalcification à vue des coupes préparées par usure (109) détache une cuticule de l'émail sans la détruire, à tel point que cette technique est classique pour la mise en évidence de la cuticule; si dans la carie la

cuticule est détruite, cette destruction qui n'est pas possible par simple décalcification ne peut donc s'effectuer que par protéolyse.

La réaction intense de coloration au bord de la tache blanche de l'émail avec la ninhydrine est donnée comme un argument en faveur de la protéolyse (135).

En la considérant comme spéculative l'hypothèse de la protéolyse-chélation doit être mentionnée en faveur de la protéolyse de l'émail (136-139).

Les examens en lumière polarisée ont mis en évidence 5 zones au niveau des caries débutantes de l'émail (63, 84, 115); l'interprétation de certaines de ces zones peut être remise en question: ainsi la conception de "reminéralisation" soulevée par GUSTAFSON (63) est discutable en fonction des milieux d'imbibition et des micro-radiographies (148, 149). Il semble aussi que même la couche externe (zone 5) à biréfringence négative soit partiellement décalcifiée (149). Dans la zone 4 on distingue souvent une pseudo-isotropie qui témoigne en plus de la décalcification d'une destruction de la trame organique. D'autre part les microespaces observés dans la zone 2 après deshydratation par l'alcool (37, 98) pourraient prendre naissance dans la trame organique elle-même.

En résumé, les arguments invoqués en faveur de la protéolyse des caries de l'émail sont de valeur très inégale. Il convient sous certaines réserves de retenir les observations de la lumière polarisée et des contrôles de la microradiographie. Si l'existence du processus protéolytique est très vraisemblable, son importance et surtout le moment auquel il se produit par rapport à la déminéralisation restent encore à préciser.

II. LES ARGUMENTS CONTRE LA CARIE-PROTÉOLYSE

La minime fraction organique de l'émail comparée à l'importante masse minérale indique *a priori* que la protéolyse comparée à la déminéralisation est quantitativement peu importante dans la destruction de l'émail.

D'autre part, dans les conditions habituelles la carie débute par l'émail où la trame organique prise dans la masse minérale est masquée par elle. L'accès à la kératine et au mucopolysaccharide acide n'est théoriquement possible dans la dent mature qu'après une déminéralisation préalable; c'est ce que confirment les conclusions des bactériologistes et enzymologistes (25-29, 41, 147).

La question de savoir si la cuticule de l'émail elle-même est directement accessible au processus protéolytique sans décalcification initiale n'a pas reçu de réponse positive. Histologiquement seule une déminéralisation de la surface de l'émail permet d'isoler la cuticule et de la rendre accessible aux enzymes protéolytiques. Aussi actuellement aucun argument n'a été donné en faveur d'une protéolyse antérieure à la déminéralisation, tandis que le contraire a été indiqué à plusieurs reprises.

D'autre part le rôle de la cuticule dans le processus carieux n'est pas connu (94). La kératine ne constitue pas une barrière à l'attaque de l'émail car des lésions typiques de l'émail peuvent être observées sous une cuticule apparemment intacte distincte d'un film bactérien.

Les lamelles qui peuvent constituer les voies organiques les plus importantes de l'émail devraient être la localisation fréquente et constante des caries si la protéolyse

en était réellement le phénomène essentiel. Or il n'en est rien, contrairement à certaines affirmations déjà anciennes des partisans de la carie-protéolyse (21, 52, 54, 55, 58), et contrairement à une interprétation récente (7): Le début des caries de l'émail est en effet complètement indépendant des lamelles (93, 94, 132, 170). Les répliques de surface de l'émail sur 300 dents cariées examinées en microscopie optique et électronique ont démontré que la coïncidence d'une carie et d'une lamelle était l'effet du hasard (132). Le nombre de lamelles plus élevé qu'on ne l'indique habituellement explique seul qu'elles coïncident accidentellement avec des foyers de carie (91-94). L'examen d'un nombre identique de coupes préparées par usure et examinées en lumière normale et polarisée a confirmé les conclusions de SCOTT et WYCKHOFF; la carie de l'émail est un processus diffus qui, de façon générale, ne suit pas la direction des lamelles mais s'étend perpendiculairement à leur direction (93, 94). Il est fréquent qu'une lamelle à proximité d'une carie de l'émail ne soit pas intéressée par le processus même si, au contact de la dentine, elle a excité la formation de dentine réactionnelle. Toutes ces constatations sont incompatibles avec la notion de carie initialement protéolytique de l'émail.

Lorsqu'une lamelle de l'émail conduit à une carie typique de la dentine, avec pigmentation jaune caractéristique, il est intéressant d'étudier la lésion de l'émail en lumière polarisée puis d'attaquer à vue la coupe par un acide. La décalcification de la coupe détruit progressivement la lésion de l'émail mais laisse subsister intacte la lamelle qui la traverse (Fig. 7), constatation faite sur un grand nombre de coupes (97). Si cette carie était réellement un phénomène protéolytique les lamelles seraient nécessairement désagrégées au sein des lésions où il est au contraire fréquent de les retrouver intactes après décalcification.

Dans le passé, on a fréquemment prétendu que les dents hypocalcifiées étaient prédisposées aux caries et les théories protéolytiques (147) s'accordent bien avec cette opinion qui a encore été défendue récemment (123). S'il arrive souvent que les dents cliniquement normales présentent à l'examen histologique des zones hypocalcifiées (61, 63) on a montré que des dents atteintes d'hypocalcification considérable étaient cependant indemmes de caries (65, 95). C'est ainsi que l'observation clinique et histologique des dents atteintes d'amélogenèse imparfaite s'accorde mal avec cette opinion jamais vérifiée de caries dépendant du degré de minéralisation de l'émail. Aussi l'observation des dents atteintes d'amélogenèse imparfaite ne s'accorde pas avec l'hypothèse d'une protéolyse dans le déclenchement des caries de l'émail.

Les observations cliniques (35, 143, 167, 168, 169) montrent une diminution importante des caries dentaires due à la période de guerre et coïncidant avec une diminution nette de la consommation des sucres raffinés (126). Une étude des lactobacilles indique qu'ils diminuent nettement lorsque la consommation des sucres est réduite (12, 85, 96) et que cette diminution persiste encore quelques mois lorsque la consommation des sucres augmente. L'expérimentation clinique met en cause plus nettement encore la consommation des sucres en précisant le pouvoir cariogène des sucres raffinés (24, 60, 85). Observations et expériences cliniques montrent de façon indiscutable (11) la part importante de l'attaque acide dans le processus carieux. La formation d'acide à partir des glucides alimentaires peut en effet être démontrée

dans la cavité buccale (45, 47, 156). Aucune observation ni expérience semblable ne vient appuyer l'hypothèse de la protéolyse dans le déclenchement des caries. Les lésions recontrées sous les bagues d'orthodontie (100b) se sont révélées être des caries typiques avec les 5 zones classiques repérées en lumière polarisée. Comme il est bien admis aujourd'hui que l'étiologie de ces lésions est le fait du ciment de scellement, il s'agit bien de caries quasi-expérimentales réalisées par l'acide phosphorique en l'absence de toute protéolyse.

La flore buccale génératrice d'acide a souvent été mise en évidence dans la bouche et à la surface des dents (17, 25-27, 110). Des bactéries protéolytiques (*Actinomyces Bovis*, *Streptococcus mitis* et lactobacilles (83)) se trouvent généralement dans la bouche mais les bactéries kératolytiques isolées dans les cavités de carie ne se trouvent pas dans la flore buccale habituelle (19).

L'expérimentation *in vivo* a permis de produire des caries chez les animaux de laboratoires qui reçoivent des régimes riches en sucres (31, 64, 112, 140, 144, 157, 171). Un abaissement du pH salivaire s'observe au niveau des caries du Hamster (85). Il n'existe aucune lésion dentaire expérimentale comparable produite par protéolyse (19).

La prophylaxie des caries est réalisée par le fluor chez l'homme et différents animaux de laboratoire parce qu'il augmente la résistance de l'émail à l'attaque acide (141). La réduction de la solubilité de l'émail par les fluorures a été soigneusement étudiée (111) et leur effet anticarie a été expérimenté chez le rat blanc (99). Aucun travail analogue chez les animaux de laboratoire n'a été publié pour établir la part de la protéolyse. La prévention obtenue par colmatage des voies organiques par le chlorure de zinc (33, 58) s'est révélée sans fondement (18, 19, 34, 117). On sait que l'émail subit de nombreuses attaques par les acides organiques pendant des périodes plus ou moins longues (46); or la surface apparemment intacte de l'émail (dont l'étude en est encore à son début (1, 61, 75) présente de multiples petites altérations comme en témoignent les répliques de surface examinées au microscope électronique (134). Ces zones de déminéralisation deviennent perméables aux substances salivaires; on conçoit que des protéines salivaires forment alors une sorte de colmatage des lésions (16, 17, 43, 69) et c'est là un des facteurs qui différencient les caries de certaines expériences grossières de décalcification *in vitro*. Dès lors, si une protéolyse des zones colmatées se produit elle n'est encore que secondaire dans le déclenchement des caries puisque des attaques acides de la surface de l'émail s'étaient produites auparavant. D'autre part, du point de vue chimique il n'existe actuellement aucune preuve indiquant une perte de substance organique dans les caries de l'émail.

L'expérimentation *in vitro* a fortement contribué à établir l'importance de la déminéralisation locale de l'émail au cours de la carie. Les examens en lumière ordinaire (118) et en lumière polarisée (36, 37, 63, 68, 87-89), les microradiographies (36, 37, 135, 149a) ont montré l'identité histologique des premiers stades des caries de l'émail *in vivo* (1, 13, 42) et *in vitro*; or les expériences réalisées *in vitro* ne font pas intervenir la protéolyse. Rappelons que la pénétration de cultures bactériennes dans l'émail immature des Hamsters constitue la seule indication bactériologique et

histologique *in vitro* qui ait été proposée en faveur de la protéolyse (83) et les conditions même de cette observation ne permettent pas de la mettre en balance avec les autres caries expérimentales.

CONCLUSIONS

Les arguments apportés en faveur de la protéolyse dans les caries de l'émail sont de valeur très inégale.

Les preuves directes données par le microscope polarisant sont peu nombreuses:

1. Présence de zones de biréfringence négative diminuée ou de zones pseudo-isotropiques antérieures à la cavitation de l'émail.

2. Propagation des lésions le long de certaines lamelles, le long des stries de Retzius et parfois le long des gaines.

Les preuves indirectes sont des hypothèses à vérifier:

1. La zone 2 examinée en lumière polarisée révèle après deshydratation par l'alcool des microespaces qui pourraient prendre naissance dans la trame organique.

2. La porte d'entrée des lésions se ferait à la surface au contact des stries de Retzius.

3. Les lésions seraient le fait d'une protéolyse-chélation.

4. Le début des caries serait dû à l'action de l'hyaluronidase d'origine bactérienne.

Actuellement il existe surtout des preuves d'une déminéralisation souvent antérieure à la protéolyse.

1. Début des caries indépendant des voies organiques les plus importantes de l'émail (lamelles).

2. Persistance de lamelles intactes dans les zones cariées de l'émail.

3. Identité avec les caries cliniques des lésions de l'émail produites *in vitro* sans protéolyse.

4. Isolement et culture des bactéries acidogènes à la surface de l'émail et absence habituelle de bactéries protéolytiques.

5. Nécessité de démasquer la protéine de l'émail par déminéralisation avant dépolymérisation.

6. Caries cliniques et caries expérimentales en rapport avec la consommation et la dégradation des sucres.

7. Indépendance du processus carieux vis-à-vis des zones d'émail hypocalcifié.

8. Présence de lésions de déminéralisation de l'émail sous une cuticule apparemment intacte.

9. Caries typiques de l'émail sous les bagues d'orthodontie produites par l'acide phosphorique des ciments.

RÉFÉRENCES

1. AMPRINO, R. et CAMANNI, F. 1956. *Acta Anat.* **28**, 217.
2. APPLEBAUM, E. 1940. *J. dent. Res.* **19**, 41.
3. AWAZAWA, Y. 1953. *Acta Anat. Nippon* **28**, No. 3.
4. AWAZAWA, Y. 1959. *Arch. Hist. Jap.* **16**, 467.

5. AWAZAWA, Y. 1959. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 2, 24.
6. AWAZAWA, Y. 1959. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* 2, 91.
7. AWAZAWA, Y., YAMADA, H., SUGAYA, T., AWAZAWA, I. et KANA, S. 1958. *Dent. J. Nihon Univ.* 1, 135.
8. BARKER, F. 1931. *J. Amer. dent. Ass.* 18, 17.
9. BARTHELD, F. VON 1958. *Tijdschr. Tandheelk.* 64, 2.
10. BAUME, L. 1959. *Rev. franç. Odont. Stom.* 6, 585.
11. BEGELMAN, A. 1952. *Stomatologuia (Moscou)* No. 1, 3.
12. BELDING, P. et BELDING, L. 1948. *J. dent. Res.* 27, 480.
13. BERGMAN, G. et ENGFELDT, B. 1954. *Acta odont. scand.* 12, 99.
14. BERNICK, M., BAKER, R., RUTHERFORD, R. et WARREN, O. 1952. *J. Amer. dent. Ass.* 45, 689.
15. BESIC, F. 1951. *J. dent. Res.* 30, 708.
16. BEUST, T. 1930. *J. Amer. dent. Ass.* 17, 1536.
17. BIBBY, B. 1935. *J. Amer. dent. Ass.* 22, 222.
18. BIBBY, B. 1952. *Aust. J. Dent.* 56, 85.
19. BIBBY, B., GUSTAFSON, G. et DAVIES, G. 1958. *Int. dent. J.* 8, 685.
20. BODECKER, C. 1924-26. *J. dent. Res.* 6, 117.
21. BODECKER, C. 1948. *N.Y. J. Dent.* 18, 252.
22. BOSE, A., BLACKWELL, R. et FOSDICK, L. 1960. *J. dent. Res.* 39, 141.
23. BOX, K. 1953. *J. Ont. dent. Ass.* 30, 344.
24. BUNTING, R. 1930. *Dent. Cosmos* 72, 399.
25. BURNETT, G. et SCHERP, H. 1949. *J. dent. Res.* 28, 638.
26. BURNETT, G. et SCHERP, H. 1951. *Oral Surg.* 4, 469.
27. BURNETT, G. et SCHERP, H. 1951. *J. dent. Res.* 30, 766.
28. BURNETT, G. et SCHERP, H. 1952. *J. dent. Res.* 31, 776.
29. BURNETT, G. et SCHERP, H. 1953. *J. dent. Res.* 32, 46.
30. CECCALDI, F., WEILL, R. et CHARPAL, O. 1952. *Rev. Odont.* 2, 112.
31. MACCLURE, F. J. 1945. *J. dent. Res.* 24, 229.
32. COOLIDGE, T. et BRIGHTMAN, V. 1958. *J. Amer. dent. Ass.* 56, 630.
33. CRAWFORD, H. 1949. *Tex. dent. J.* 67, 96.
34. DANNENBERG, J. et BIBBY, B. 1950. *J. dent. Res.* 29, 177.
35. DECHAUME, M. et CAUHÉPÉ, J. 1942. *Pr. méd.* No. 28.
36. DARLING, A. 1956. *Brit. dent. J.* 101, 289, 329.
37. DARLING, A. 1958. *Brit. dent. J.* 105, 119.
38. DREIZEN, S. et SPIES, T. 1951. *Oral Surg.* 4, 388.
39. DREIZEN, S. et al. 1957. *J. dent. Res.* 36, 233.
40. ENGEL, M. 1948. *J. dent. Res.* 27, 681.
41. ENGEL, M. 1950. *J. Amer. dent. Ass.* 40, 284.
42. ENGFELDT, B. et HAMMARLUND-ESSLER, E. 1957. *Acta odont. scand.* 14, 293.
43. ENRIGHT, J., FRIESELL, H. et TRESCHER, M. 1932. *J. dent. Res.* 12, 759.
44. EVANS, G. et PROPHET, A. 1950. *Lancet* 1950i, 290.
45. FOSDICK, L. 1947. *N.Y. J. Dent.* 17, 55.
46. FOSDICK, L. 1949. *Northw. Univ. Bull.* 49, 4.
47. FOSDICK, L. et CAMPAIGN, M. 1939. *J. dent. Res.* 18, 261.
48. FRANK, R. 1955. *Rev. belge Stom.* 52, 228.
49. FRANK, R. 1957. Thèse, Doctorat Medecine No. 42, Strasbourg.
50. FRANK, R. 1959. *Actualités Odontostomat.* 45, 13.
51. FRISBIE, H. 1950. *Int. dent. J.* 1, 1.
52. FRISBIE, H. et NUCKOLLS, J. 1947. *J. dent. Res.* 26, 181.
53. FRISBIE, H. et NUCKOLLS, J. 1947. *J. dent. Res.* 26, 470.

54. FRISBIE, H., NUCKOLLS, J. et DE SAUNDERS, J. 1944. *J. Amer. Col. Dent.* **11**, 243.
55. GOTTLIEB, B. 1921. *Z. Stomat.* **19**, 129.
56. GOTTLIEB, B. 1944. *J. dent. Res.* **23**, 141.
57. GOTTLIEB, B. 1944. *J. dent. Res.* **23**, 379.
58. GOTTLIEB, B. 1947. *Dental Caries*. Lea & Febiger, Philadelphia.
59. GOTTLIEB, B., DIAMOND, M. et APPLEBAUM, E. 1946. *Amer. J. Orthodont.* **32**, 365.
60. GUSTAFSON, BENGT et al. 1954. *Acta odont. scand.* **11**, 232.
61. GUSTAFSON, A. G. 1959. *Odont. Tidskr.* **67**, 361.
62. GUSTAFSON, G. 1945. *Odont. Tidskr.* **53**, Supplement.
63. GUSTAFSON, G. 1947. *Acta odont. scand.* **15**, 13.
64. GUSTAFSON, G. et al. 1953. *Odont. Tidskr.* **61**, 836.
65. GUSTAFSON, G., NYSTROM, P. et STELLING, E. 1947. *Odont. Tidskr.* **55**, 183.
66. GUZMAN, D., BRUDEVOLD, F. et MERMAGEN, H. 1957. *J. Amer. dent. Ass.* **55**, 509.
67. HALL, D. 1958. *J. dent. Res.* **37**, 243.
68. HALS, E., MORCH, T. et SAND, F. 1955. *Acta odont. scand.* **13**, 85.
69. HARDWICK, J. et MANLEY, E. 1952. *Brit. dent. J.* **92**, 225.
70. HELMCKE, J. 1953, 1957. *Atlas des Menschlichen Zahnes im Elektronenmikroskopischen Bild*. Transmare Photo, Berlin.
71. HELMCKE, J. 1955. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **10**, 1461.
72. HELMCKE, J. 1959. *Mikroskopie* **13**, 313.
73. HELMCKE, J. 1959. *Naturwissenschaften* **7**, 00.
74. HELMCKE, J. 1960. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **15**, 155.
75. HELMCKE, J. et RIENITZ, J. 1959. *Mikroskopie* **13**, 345.
76. HODSON, J. 1953. *Oral Surg.* **6**, 496.
77. HODSON, J. 1953. *Brit. dent. J.* **94**, 141.
78. HODSON, J. 1955. *Proc. R. Soc. Med.* **48**, 641.
79. HOWE, P. 1924. *J. Amer. dent. Ass.* **11**, 1149.
80. HUGILL, R. et BOX, H. 1950. *J. dent. Res.* **29**, 669.
81. HURST, V., FRISBIE, H. E., NUCKOLLS, J. and MARSHALL, M. F. 1953. *Science* **107**, 42.
82. HURST, V. 1950. *J. dent. Res.* **29**, 571.
83. HURST, V. et al. 1953. *Oral Surg.* **6**, 976.
84. JACOBS, H., COOLIDGE, T. et BESIC, H. 1958. *Brit. dent. J.* **104**, 275.
85. JAY, P. 1947. *Amer. J. Orthodont.* **33**, 162.
86. JOHANSEN, E. et ROGOSA, M. 1957. *Univers. Rochester Dent. Res. Fellowship Program Proceedings*, 25th year Celebration.
87. KEIL, A. 1937. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* **4**, 60.
88. KEIL, A. 1949. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* **14**, 947.
89. KEIL, A. 1958. *Int. dent. J.* **8**, 171.
90. KENNEDY, J., TEUSCHER, G. et FOSDICK, L. 1953. *J. Amer. dent. Ass.* **46**, 423.
91. KERÉBEL, B. 1958. *Rev. mens. Suisse Odont.* **69**, 159.
92. KERÉBEL, B. 1959. *Rev. Franç. Odontostomat.* **6**, 317.
93. KERÉBEL, B. 1959. *Actualités Odontostomat.* **46**, 197.
94. KERÉBEL, B. 1959. *Rev. Franç. Odontostomat.* **6**, 1089.
95. KERÉBEL, B. 1960. *Actualités Odontostomat.* **49**, 61.
96. KITCHIN, P. et PERMAR, D. 1948. *J. dent. Res.* **27**, 316.
97. KLEES, L. 1958. *Cahiers Odonto-Stomat.* **8**, 17.
98. KOSTLAN, J. 1959. *Odont. Revy* **10**, 233.
99. KONIG, K., MARTHALER, TH. et MUHLEMAN, H. 1957. *Helv. Odont. Acta* **1**, 33.
100. KRONFELD, R. 1939. *Histopathology of the Teeth*. Lea & Febiger, Philadelphia.
100b. LEFKOWITZ, W. 1939. *J. dent. Res.* **18**, 264.

101. LENZ, H. 1956. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **11**, 1371.
102. LENZ, H. 1958. *Yale J. Biol. Med.* **31**, 164.
103. LITTLE, K. 1953. *J. dent. Res.* **32**, 734.
104. LOSEE, F. et HESS, W. 1949. *J. dent. Res.* **28**, 512.
105. MANDEL, I. 1955. *J. Amer. dent. Ass.* **51**, 432.
106. MANLEY, E. et HARDWICK, J. 1951. *Brit. dent. J.* **90**, 36.
107. MATSUMIYA, S. et TAKUMA, S. 1954. *Atlas of Electron Micrography of the Human Dental Tissues*. Tokyo Dental College Press, Tokyo.
108. MILLER, W. 1890. *Microorganisms of the Human Mouth*. White, Philadelphia.
109. MILLER, W. 1902. *Dent. Cosmos* **44**, 425.
110. MORRIS, E. 1954. *Brit. dent. J.* **97**, 29.
111. MUHLEMAN, H., SCHMID, H. et KONIG, K. 1957. *Helv. Odont. Acta* **1**, 23.
112. MURACCIOLE, J. et DOMINGUEZ, A. 1957. *Rev. Odont. (Argentina)* **45**, 281.
113. MYERS, H. 1955. *J. dent. Res.* **34**, 38.
114. NISHIMURA, T. 1926. *Schweiz. Mschr. Zahnheilk.* **36**, 491.
115. NUCKOLLS, J., HUTTON, W., HURST, V., FRISBIE, H. et MARSHALL, M. 1952. *J. Amer. dent. Ass.* **44**, 529.
116. NUCKOLLS, J., KILLIAN, B. et FRISBIE, H. 1951. *J. dent. Res.* **30**, 690.
117. PELTON, W. 1950. *J. dent. Res.* **29**, 756.
118. KITCHIN, P. et PERMAR, D. 1948. *J. dent. Res.* **27**, 316.
119. PINCUS, P. 1947. *Biochem. J.* **41**, 27.
120. PINCUS, P. 1948. *Nature, Lond.* **161**, 1014.
121. PINCUS, P. 1949. *Brit. dent. J.* **86**, 226.
122. PINCUS, P. 1950. *J. Calif. State dent. Ass.* **26**, 16.
123. REINHARDT, U. 1958. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* **28**, 102.
124. ROSEBURY, T., KARSHAN, M. et FOLEY, G. 1933. *J. dent. Res.* **13**, 379.
125. ROTH, G. 1957. *Oral Surg.* **10**, 1105.
126. SCHULERUD, A. 1948. *Odont. Tidskr.* **56**, 161.
127. SCHMIDT, W. et KEIL, A. 1958. *Die Gesunden und die Erkrankten Zähngewebe des Menschen und der Wirbeltiere im Polarisationmikroskop*. München.
128. SCOTT, D. 1953. *Int. dent. J.* **4**, 64.
129. SCOTT, D. 1955. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **60**, 575.
130. SCOTT, D. et ALBRIGHT, J. 1954. *Oral Surg.* **7**, 64.
131. SCOTT, D., MUSSING, M., SOGNAES, R. et WYCKOFF, R. 1952. *J. dent. Res.* **31**, 78.
132. SCOTT, D. et WYCKOFF, R. 1952. *J. Amer. dent. Ass.* **44**, 377.
133. SCOTT, D., NYLEN, M. et TAKUMA, S. 1959. *Rev. Belge Sci. dent.* **14**, 329.
134. SCOTT, D., KAPLAN, H. et WYCKOFF, R. 1949. *J. dent. Res.* **28**, 31.
135. SHARPENAK, A., NIKOLAEVA, N. et MAGID, E. 1957. *Stomatologuia (Moscou)* No. **2**, 8.
136. SHATZ, A. et MARTIN, J. 1955. *Proc. Pa. Acad. Sci.* **29**, 48.
137. SHATZ, A., KARLSON, K. et MARTIN, J. 1955. *N.Y. St. dent. J.* **21**, 438.
138. SHATZ, A., MARTIN, J. et KARLSON, K. 1956. *J. dent. Res.* **35**, 603.
139. SHATZ, A., KARLSON, K. et MARTIN, J. 1957. *Ann. Dent.* **16**, 37.
140. SHAW, J. 1952. *Nutrition and Dental Caries*. Publication 125 (Nat. Acad. Sci., Nat. Res. Council, Washington).
141. SHAW, J. 1954. *Fluoridation as a Public Health Measure*. Amer. Ass. Advanc. Sci., Washington.
142. SHOBUSAWA, M. 1952. *Okajimas Folia anat. Japonica* **24**, 371.
143. SOGNAES, R. 1948. *Amer. J. Dis. Child.* **75**, 792.
144. SOGNAES, R. 1948. *J. Amer. dent. Ass.* **37**, 676.
- 144a. SOGNAES, R. 1955. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **60**, 545.

145. SOGNNÆS, R. et VOLKER, J. 1941. *Amer. J. Physiol.* **133**, 112.
146. SOGNNÆS, R. et SHAW, J. 1952. *J. Amer. dent. Ass.* **44**, 489.
147. SOGNNÆS, R. et WISLOCKI, G. 1950. *Oral Surg.* **3**, 1283.
148. SONI, N. et BRUDEVOLD, F. 1959. *J. dent. Res.* **38**, 1181.
149. SONI, N. et BRUDEVOLD, F. 1959. *J. dent. Res.* **38**, 1187.
149a. SONI, N. et BRUDEVOLD, F. 1960. *J. dent. Res.* **39**, 233.
150. STACK, M. 1953. *J. Bone Jt Surg.* **35B**, 494.
151. STACK, M. 1955. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **60**, 585.
152. STACK, M. 1954. *J. Amer. dent. Ass.* **48**, 297.
153. STACK, M. et WILLIAMS, G. 1952. *Brit. dent. J.* **92**, 261.
154. STEINMAN, R. 1960. *J. dent. Res.* **39**, 150.
155. STEINMAN, R., HEWES, C. et WOODS, R. 1960. *J. dent. Res.* **39**, 592.
156. STEPHAN, R. 1944. *J. dent. Res.* **23**, 257.
157. STEPHAN, R. et HARRIS, M. 1955. *Advances in Experimental Caries Research*. Amer. Ass. Advanc. Sci., Washington.
158. STRÖM, A. 1948. *Acta med. scand. Suppl.* 243.
159. STRÖM, A. 1948. *Norsk Tannl. Tid.* **59**, 467.
160. SULLIVAN, H. 1954. *J. dent. Res.* **33**, 218.
161. SULLIVAN, H. 1954. *J. dent. Res.* **33**, 231.
162. SUZUKI, A., TAKUMA, S., OSAWA, Y. et TSUCHIKURA, H. 1950. *Trans. Soc. Path. Japan* **39**, 255.
163. SUZUKI, A., TAKUMA, S., OSAWA, Y. et TSUCHIKURA, H. 1950. *Rinshō Shika* **89**, 1.
164. TAKUMA, S. 1955. *J. dent. Res.* **34**, 152.
165. TAKUMA, S., KURAHASHI, Y., YOSHIOKA, N. et YAMAGUCHI, A. 1956. *Oral Surg.* **9**, 328.
166. TAKUMA, S., SUZUKI, A., OSAWA, Y. et TSUCHIKURA, H. 1949. *Trans. Soc. Path. Japan* **38**, 156.
167. TOVERUD, G. 1946. *Odont. Tidskr.* **54**, 277.
168. TOVERUD, G. 1949. *Proc. R. Soc. Med.* **42**, 249.
169. TOVERUD, G. 1949. *J. Amer. dent. Ass.* **39**, 127.
170. WILDBOLZ, G. 1950. *Schweiz. Mschr. Zahnheilk.* **60**, 203.
171. ZEPPLIN, M. et al. 1950. *J. Nutr.* **60**, 1177.

MEMBRANE PHENOMENA IN CARIOUS DISSOLUTION OF THE TEETH*

F. VON BARTHELD

Polikliniekenen Laboratorium voor Sosisodontie, Ryksuniversiteit
Groningen, Netherlands

Abstract—Experiments were described that have been conducted to ascertain the role of Donnan membrane effects in carious dissolution of the mineral components of the tooth structures.

When a solution of an ionized macromolecular substance (in biological environment this is practically always some protein or a mixture of proteins) is separated from another solution by a semipermeable membrane, which arrests the macromolecules but allows free passage to all small ions from both sides, the latter are distributed over both solutions in a peculiar way. Under certain circumstances, depending on the charge of the macromolecule, a drop of the pH on one side of the membrane can be effected, accompanied by a rise of the pH on the other side. We applied this principle to the problem of carious tooth decalcification, the enamel surface being permeable to small ions only. It was possible to predict and obtain results *in vitro* that closely resemble actual caries, much more so than could be achieved until now with the use of buffered or unbuffered acids.

Further experiments, partly still under way, strongly suggest that the beneficial effect of saliva on the tooth substance, mostly described as a mineralizing or remineralizing activity, can also be ascribed to a Donnan membrane effect, the macromolecular agent being salivary mucin.

Résumé—Des expériences ont été entreprises pour établir le rôle des effets de membrane de Donnan dans la dissolution des composés minéraux de la dent au cours de la carie dentaire.

Lorsqu'une solution d'une substance macromoléculaire ionisée (dans un milieu biologique, qui est pratiquement toujours une protéine ou un mélange de protéines) séparée d'une autre solution par une membrane semi-perméable, celle-ci arrête les macromolécules, mais laisse passer tous les ions de petites tailles situés de part et d'autre. Ces petits ions se distribuent d'une façon particulière dans les deux solutions. Dans certaines conditions, liées à la charge de la macromolécule, une chute du pH peut s'effectuer d'un côté de la membrane, avec une élévation du pH du côté opposé. Ce principe a été appliqué par l'auteur au problème de la décalcification de la dent cariée, la surface de l'émail n'étant perméable qu'à des ions de petites tailles. Il a été possible de prévoir et d'obtenir des résultats *in vitro* qui ressemblent de très près aux caries "naturelles"; beaucoup plus fidèlement même que les résultats obtenus avec des solutions d'acides tamponnées ou non.

D'autres expériences, partiellement encore en cours, suggèrent que l'effet bénéfique de la salive sur les dents, décrit le plus souvent comme une activité de minéralisation ou de reminéralisation, peut aussi être qualifié d'effet de membrane de Donnan, l'agent macromoléculaire étant la mucine salivaire.

Zusammenfassung—Es werden Versuche beschrieben die durchgeführt wurden, um die Rolle de Donnan-Membran-Effekts bei der Herauslösung der mineralischen Komponenten aus den Zahnsbstanzen bei der Karies zu verdeutlichen.

* This paper is not included in the *Proceedings* because it has been submitted for publication in the *Journal of the American Dental Association*.

Wenn eine Lösung einer ionisierten makromolekularen Substanz (im biologischen Bereich ist dieses praktisch immer ein Protein oder eine Mischung von Proteinen) von einer anderen Lösung durch eine semipermeable Membran getrennt wird, die Makromoleküle festhält, alle kleinen Ionen jedoch in beiden Richtungen passieren lässt, werden letztere in beiden Lösungen auf eine bestimmte Weise verteilt. Unter gewissen Umständen, die von der Ladung der Makromoleküle abhängen, kann ein Absinken des pH auf der einen Seite der Membran hervorgerufen werden, das mit einem Steigen des pH auf der anderen Seite einhergeht. Wir haben dieses Prinzip auf das Problem der kariösen Zahntentkalkung übertragen, wobei die Schmelzoberfläche als nur für kleine Ionen permeabel angesehen wird. Es war möglich, *in-vitro*-Ergebnisse vorauszusagen und zu erzielen, die "natürlicher" Karies weitgehend gleichen, jedenfalls weit mehr als dieses bisher durch gepufferte oder ungepufferte Säuren erreicht werden konnte.

Weitere noch nicht abgeschlossene Untersuchungen geben deutliche Hinweise dafür, dass der schützende Effekt des Speichels für die Zahnschmelz, meist als mineralisierende oder remineralisierende Wirkung bezeichnet, auch dem Donnan-Membran-Effekt zugeschrieben werden kann, wobei das Speichelmucin das makromolekulare Agens darstellt.

EXPERIMENTS WITH CALCIUM CARBONATE PHOSPHATES AND THE EFFECT OF TOPICAL APPLICATION OF SODIUM FLUORIDE

O. R. TRAUTZ and R. R. ZAPANTA

Department of Biochemistry and Guggenheim Institute for Dental Research,
New York University College of Dentistry, New York, N.Y., U.S.A.

Abstract—The experiments illuminate the behaviour of calcium phosphate precipitates. Coprecipitated impurities of secondary calcium phosphate and of calcium carbonate disturb the crystallization of the apatite. They even can completely destroy the apatite structure: the precipitate becomes an amorphous aggregate. The amorphous state of the precipitate may be preserved for some time, when the conditions of its formation remain unchanged. Under changed conditions the impurities can react with each other and cause a recrystallization of the precipitate. The same impurities are present in the biological apatites of bones and teeth, where they behave in the same way.

The effect of sodium fluoride upon various calcium phosphates and carbonates and upon dental enamel and dentine is investigated. The results can explain the caries inhibiting effect of topical application of sodium fluoride: the carbonate and the secondary phosphate, which are the enamel components most soluble in weak acid, are replaced by calcium fluoride, which is very little soluble in acid. This replacement substantially impedes the self-accelerating effect of the initial acid attack upon the enamel, viz. the enlargement of the diffusion paths which accompanies the early stages of the demineralization.

Résumé—Un rapport sur des expériences qui élucident le comportement des précipités de phosphate de calcium. La cristallisation de l'apatite peut être dérangée et la structure apatitique peut être détruite complètement par la coprécipitation des impuretés du phosphate secondaire de calcium et du carbonate de calcium: le précipité obtenu n'est qu'un carbonate phosphate de calcium tout à fait amorphe. Si on maintient les conditions de leur formation ces précipités peuvent être stables dans une phase amorphe. Si on change les conditions ils peuvent réagir l'un avec l'autre en causant la recrystallisation du précipité. On trouve les mêmes impuretés dans les apatites biologiques de l'os et des dents, qui se comportent de la même façon.

Nous avons étudié l'effet du fluorure de soude sur plusieurs phosphates et carbonates de calcium et sur l'émail et la dentine de dents. Les résultats nous ont fourni une explication de l'effet inhibiteur de l'application topique du NaF: le carbonate et le phosphate secondaire, qui se dissolvent au plus facile en acides faibles, se transforment en fluorure de calcium, que est extrêmement peu soluble dans les acides. Ainsi résulte un blocage considérable de l'effet auto accélérant de l'attaque primaire d'acide, c'est à dire, l'élargissement des voies de diffusion par la déminéralisation.

Zusammenfassung—Die Experimente beleuchten das Verhalten von Kalziumphosphatniederschlägen. Kopräzipitierte Verunreinigungen von sekundärem Kalziumphosphat und von Kalziumkarbonat beeinträchtigen die Kristallisation des Apatits und können seine Struktur vollständig vernichten: das Präzipitat wird ein amorphes Kalzium-Karbonatphosphat. Das Präzipitat kann beständig sein in seinem amorphen Zustand, wenn die Bedingungen seiner Bildung beibehalten werden. Oder unter

geänderten Bedingungen können die Verunreinigungen miteinander reagieren und eine Rekristallisation des Präzipitats veranlassen. Die selben Verunreinigungen sind in den biologischen Apatiten der Knochen und Zähne vorhanden, wo sie sich in gleicher Weise verhalten.

Die Wirkung von Natriumfluorid auf verschiedene Kalziumphosphate und -Karbonate und auf Zahnschmelz und Dentin wird untersucht. Die Resultate geben uns die Erklärung für die kariesvermindernde Wirkung von örtlicher Anwendung von Natriumfluoridlösung: Karbonat und Sekundärphosphat, die in schwacher Säure löslichsten Komponenten, werden in Kalziumfluorid verwandelt, das in Säure sehr wenig löslich ist. Dadurch wird die sichselbstbeschleunigende Wirkung des ersten Säureangriffs auf den Schmelz, nämlich die durch die Demineralisation verursachte Erweiterung der Diffusionswege im Schmelz, entscheidend gehindert.

INTRODUCTION

THE MINERAL in dental enamel as well as in dentine and bone is chiefly a calcium phosphate. The crystalline structure of the mineral is essentially that of an apatite. The words "chiefly" and "essentially" limit the direct statements: the calcium phosphate is not pure and the impurities disturb the crystallization of the apatite.

Chemical analyses tell us what impurities are present, but they can not tell us in what form they are present. X-ray diffraction may tell this, if the impurities are crystallized as separate phases. If the impurity forms mixed crystals with the host, X-ray diffraction may tell it, provided that the impurity causes a measurable change in the unit cell dimensions (length of a and c axes) of the apatite. Higher contents of impurities, however, may disturb the crystallization of the apatite to such an extent that the diffraction peaks become too broad, thereby defeating the precise determination of the unit cell dimensions and destroying the clues to the distribution of the impurity in the precipitate.

Also, if several impurities are simultaneously present we would assume that their effects on the unit cell dimensions are essentially additive: a contracting and an expanding effect may more or less cancel each other and the unit cell dimensions would simulate those of a purer apatite.

Thus the direct information obtained from X-ray diffraction experiments with the mineral in these tissues is limited to the observations:

- (1) that no separate phase can be detected beside the apatite;
- (2) that the apatite in the enamel is less well crystallized than a good mineral apatite and has slightly different unit cell dimensions from those of the pure well crystallized OH apatite; and
- (3) that the apatite in the other tissues is too poorly crystallized to tell anything about the distribution of its impurities.

It is necessary to make other experiments to learn more about the behaviour of the apatite and of the impurities during precipitation, about the structure of the precipitates, and about their stability and reactions with the surrounding fluids. In these studies X-ray diffraction is used as an essential tool.

The first part of this report deals with calcium phosphate precipitated in absence and presence of carbonate; the second part deals with their behaviour towards sodium fluoride solution.

CALCIUM CARBONATE PHOSPHATES

Precipitation of calcium phosphate from a neutral aqueous solution of sodium phosphate throws down together with the apatite some secondary calcium phosphate, so that the Ca/P ratio of the precipitate falls below that of apatite.

The precipitate gives an apatitic diffraction pattern without lines of crystallized secondary phosphate. We do not know yet exactly in what way the secondary phosphate is contained in the precipitate. It may be contained as an additive impurity (of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dispersed through the apatite, similarly as large dye molecules may be dispersed through a simple inorganic salt crystal. Or the HPO_4^- ions may substitute for the PO_4^{3-} in the apatite structure, since the two ions have similar shape. It seems possible that by combining the results of the Ca, P and H_2O determinations with the temperature dehydration curves of a series of precipitates a decision could be reached. Until then we shall treat the precipitate as an additive system of apatite and CaHPO_4 or $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

How much HPO_4^- will be coprecipitated with the apatite depends on the $(\text{HPO}_4^-)/(\text{PO}_4^{3-})$ ratio in the solution, which in turn depends on or determines the pH. Higher concentrations of phosphate tend to raise the HPO_4^- content of the precipitate. In the neighbourhood of pH 7 the PO_4^{3-} ions in the solution are outnumbered a millionfold by the HPO_4^- (and H_2PO_4^-) ions. Thus, in spite of the very great discrimination of the growing apatite crystal against the inclusion of HPO_4^- , an appreciable amount of it is included and lowers the Ca/P ratio of the precipitate.

If carbonate ions are also present in the phosphate solutions, they compete with the phosphate ions for the precipitating Ca ions and the apatitic precipitate will contain besides HPO_4^- , also CO_3^{2-} ions. Again, we are not yet sure whether the calcium carbonate is to be considered an additive impurity or a substitution in the apatite. In biological samples of carbonate phosphates the slight contraction which accompanies the CO_3 substitution in the well crystallized carbonate apatite is not evident. So far, we are inclined to consider it an additive precipitation, so that the composition of the precipitate may be expressed as the sum of $n\text{CaCO}_3 + m\text{Apatite}$, particularly since we can make *in vitro* such precipitates having total Ca/P ratios far above that of apatite (1.67). This does not preclude that in the well crystallized mineral and synthetic carbonate apatites a substitution of CO_3 for PO_4 may take place.

The presence of carbonate further reduces the degree of crystallinity of the apatite, which already has been lowered by the presence of the secondary phosphate. Increasing contents of carbonate will increasingly lower and broaden the diffraction peaks until the diffraction pattern reveals a completely amorphous state of the precipitate. Fig. 1 (a) shows the diffraction curve of a precipitate obtained by adding 75 ml Ca acetate (0.1 M) to a mixture of 100 ml $\text{H}_2\text{O} + 250$ ml NaHCO_3 (0.1 M) + 50 ml Na_2HPO_4 (0.1 M). During precipitation the pH dropped from 8.2 to 7.0. The molar ratio of the reagents, Ca:P:C, is 1.5:1:5. The amount of Ca added is insufficient to precipitate all the phosphate or all the carbonate in the solution. There will remain an excess of phosphate and a large excess of carbonate in the solution with which the precipitate attains equilibrium. The diffraction curve

indicates that the crystals are so poorly crystallized that one could not say what their basic structure is, if one did not already know the apatite pattern and the attenuation of its peaks by coprecipitation of the secondary phosphate and carbonate.

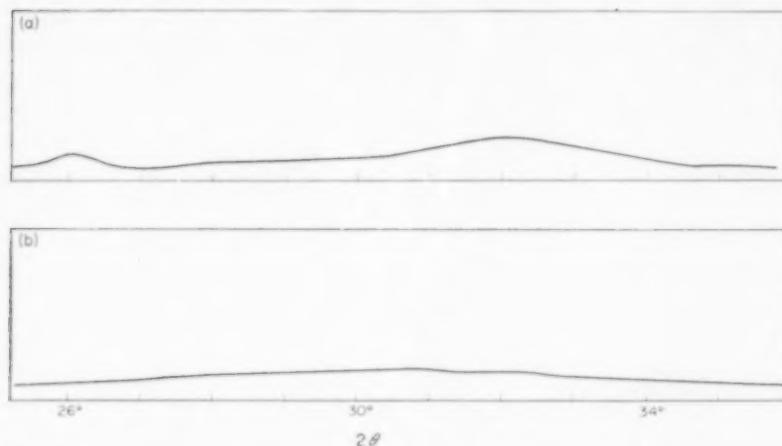


FIG. 1. Diffractometer curves of calcium carbonate phosphate precipitates. (a) from solutions with Ca:P:C=1.5:1:5. Slight apatitic order still recognizable. (b) from solutions with Ca:P:C=1.5:1:17. Completely amorphous aggregate.

If the carbonate concentration in the solution is further increased, e.g. to a molar ratio Ca:P:C=1.5:1:17, a precipitate is obtained whose diffraction pattern indicates a completely amorphous structure (Fig. 1 b). Even the apatite's 002 line near $26^\circ 2\theta$, which was preserved longest, is now completely lost. This material cannot be called apatitic or calcitic; it is just an amorphous calcium carbonate phosphate and it is in equilibrium with the solution from which it has been separated.

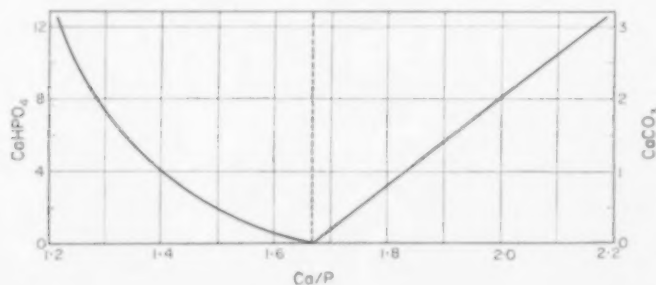


FIG. 2. Composition of the autoclaved calcium carbonate phosphate precipitates. Abscissa: total Ca/P ratio (molar). Ordinates: mols CaHPO_4 (left) or mols CaCO_3 (right) per mol $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

When we place the poorly crystallized or amorphous precipitates with little water in a crucible in the autoclave and heat them overnight at 360°C under 200 atm. steam pressure, we obtain crystalline products. We can analyse these products by X-ray diffraction and find that the total Ca:P ratio of the precipitate is of prime importance in determining the type of the products formed. At a ratio of 1.67, the product is an apatite; below 1.67 we find the lines of crystallized CaHPO_4 (monetite), and above 1.67, those of crystallized CaCO_3 (calcite) in addition to those of apatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. The amount of monetite or of calcite in the mixture and the corresponding Ca/P are plotted in Fig. 2.

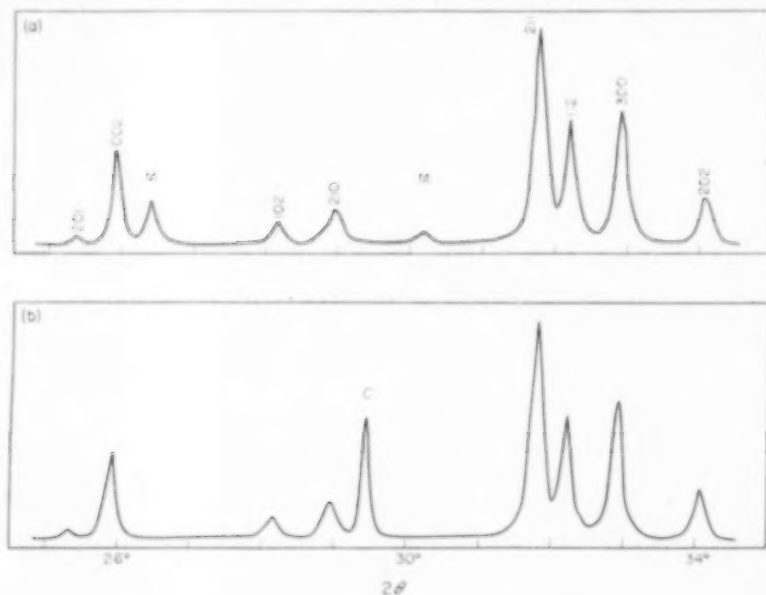


FIG. 3. Diffractometer curves of mixtures of (a) 7 monetite + 4 calcite, (b) 6 monetite + 5 calcite, after they have been autoclaved. The products are mixtures of (a) 1 apatite + 1 monetite, (b) 1 apatite + 1 calcite.

Under the conditions of the autoclave treatment the secondary phosphate reacts with the carbonate present in the precipitate according to: $6\text{CaHPO}_4 + 4\text{CaCO}_3 \rightarrow 1\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 4\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Any excess of one of the reactants crystallizes as monetite or calcite. Not only amorphous calcium carbonate phosphate reacts in this way, but also well crystallized monetite and calcite in stoichiometric amounts react to form apatite. The diffraction curves of an autoclaved mixture of 7 monetite and 4 calcite and of 6 monetite and 5 calcite are shown in Fig. 3 (a) and (b). From an aqueous magnesium free solutions, always the basic apatite is formed and not the neutral whitlockite $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ which would be hydrolysed by water to apatite and secondary phosphate (TRAUTZ, FESSENDEN and NEWTON, 1954, 1955).

As water and CO_2 are lost in the autoclave reaction these diffraction curves give only limited information on the compositions of the original precipitates. To describe it more fully it is necessary to determine by chemical analyses Ca, P, CO_3 , H_2O . After subtracting the Ca bound to CO_3 from the total Ca, one obtains a Ca/P ratio from which the amount of secondary phosphate in the original precipitate is determined (Fig. 2).

The neutralizing reaction between secondary phosphate and carbonate proceeds already at the temperature of boiling water. Suspensions of stoichiometric mixtures (6:4) of monetite and calcite in water at 100°C for 1 week produced a well crystallized OH apatite. At room temperature the reaction is sufficiently slowed down that a like suspension did not reveal any apatite after 2 days stirring. After stirring it 1 month, however, the suspension had changed into a poorly crystallized apatite.

On the basis of our experiments which illuminate the behaviour of the calcium carbonate and the acid and basic calcium phosphate, we conclude that from solutions containing sodium carbonate and phosphate near pH 7, secondary calcium phosphate and carbonate precipitate together with apatite, in relative amounts depending on their concentrations in the solution. The amount of secondary phosphate in the precipitate is determined from its Ca/P ratio after the carbonate bound calcium has been deducted from the total calcium of the analysis: $(\text{Ca}_{\text{total}} - \text{Ca}_{\text{Carbonate}})/\text{P}$.

While the calcium carbonate and secondary calcium phosphate slowly react and "neutralize" each other and recrystallize to apatite when they are suspended in plain water (from which CO_2 is lost), the amorphous precipitates are much more stable when in contact with the sodium salt solutions from which they have been precipitated.

Considering now the biological precipitations of calcium phosphates, like those in bone and teeth, we assume that sufficiently similar conditions exist, so that *in vivo*, as *in vitro*, both carbonate and secondary phosphate are coprecipitated with the apatite. They will remain as such in the precipitate as long as the surrounding liquid retains its concentrations of carbonate and phosphate ions at the same level.

SODIUM FLUORIDE EFFECT

When the caries reducing effect of fluoridated waters was discovered one tried to explain this effect by a transformation of the hydroxyl apatite of the enamel into fluorapatite, which was known to be less soluble in weak acids than the hydroxyl apatite. This explanation had to be abandoned when chemical analyses of the enamel of teeth yielded only enough fluorine to replace one out of every 300 hydroxyl groups in the apatite (with 1 p.p.m. F in the water supply) or one out of every 100 hydroxyl groups (with 6 p.p.m. F in the water supply) (TRAUTZ, 1953). It is inconceivable that such a limited substitution should produce a reduction in the apatite solubility great enough to explain the 60 per cent reduction in the caries incidence.

However, the original explanation had given the impetus to experiments with direct application of fluoride to the tooth surface in an attempt to produce the less soluble fluorapatite. It was assumed that the F^- and OH^- ions could exchange positions by diffusion through the crystal in the "channels" along the hexagonal

axes, similar to the cation exchange in the mineral zeolites or in the modern ion exchange resins. The apatites, in fact, do not allow for such a diffusion within its structure at biological temperatures (TRAUTZ and FESSENDEN, 1956). Early experiments could not demonstrate the formation of F apatite. Instead, on the surface of the enamel, when immersed in NaF solution for 2 weeks, a layer of calcium fluoride developed. The electron microscope pictures of the surface replica (SCOTT, PICARD and WYCKOFF, 1950) even show the shape of the crystals: cube-octahedron combination and electron diffraction identified them. TRAUTZ (1951) immersed a strip of human enamel in NaF solution (2%) for 2 weeks and obtained the two CaF_2 diffraction lines at 28.3° and 47.0° (2θ , Cu K_α). The enamel strip, $50 \times 80 \mu$ across, was cut parallel to the enamel rods and was mounted in the cylinder axis of an X-ray powder camera. Thus the preferred orientation of the apatite in the enamel strip was such that its 102 and 222 reflections did not fall on the equator and could not superimpose themselves on the 111 and 220 reflections of the fluoride, which are its only two reflections in the lower angle range. By this experimental set-up the presence of the crystallized calcium fluoride could be demonstrated unequivocally.

The formation of the calcium fluoride seemed to require a decomposition of the apatite, whereby phosphate goes into solution according to $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 20\text{NaF} \rightarrow 10\text{CaF}_2 + 6\text{Na}_3\text{PO}_4 + 2\text{NaOH}$. In order that this etching action of NaF may be tested, a crystal of mineral OH apatite was immersed in 2% NaF solution for 1 month.

The failure to demonstrate the CaF_2 formation with a well crystallized OH apatite prompted us to expand our programme and test the reactivity of several other calcium salts in NaF solution (TRAUTZ, FESSENDEN and ZAPANTA, 1959) with the aim of finding a less strained explanation for the enamel's reaction with the NaF solution. Among the calcium salts selected were those somehow related to the tooth mineral, i.e. carbonates and phosphates. The calcium salts had to be immersed in the 2% NaF solution and thereafter examined by X-ray diffraction for the presence of CaF_2 .

In a few cases we could find single crystals of the calcium salt with a natural face large enough ($0.5\text{--}2 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) to be mounted in the specimen plane of the diffractometer. For this purpose a small box of metacrylate was attached to the usual flat specimen holder and partially filled with glass or gelatin powder. The crystal is then pressed into the powder so that its reflecting surface is coplanar with the surface of the holder. In this arrangement there are no reflections of the single crystal which could interfere with the detection of the CaF_2 .

A calcite single crystal (cleavage rhombohedron) showed a peculiar way of attack. The clear crystal became opaque white, the opaqueness penetrating from the surface and from some cleavage cracks to deeper layers (Fig. 4). After 2 months it had reached a depth of 0.3 mm. The replacement of the CaCO_3 by CaF_2 must have proceeded in a very orderly fashion as the original lustre of the calcite surface was retained through its transformation. The CaF_2 is well oriented with its 111 direction perpendicular to, and its cleavage plane 111 parallel to the cleavage plane of the calcite. The molecular volume of the CaF_2 in fluorite is 33 per cent smaller than that of the CaCO_3 in calcite. This shrinkage facilitates the diffusion of F ions into, and of the CO_3 ions out of, the crystal.

EXPERIMENTS WITH CALCIUM CARBONATE PHOSPHATES



FIG. 4. Calcite crystal (cleavage rhombohedron), immersed for 2 months in 2% NaF solution, shows the transformation into fluorite CaF_2 .

Vol.
4
1961

On thin clear crystal plates of brushite, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and on the iso-structural gypsum, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, the replacement by CaF_2 was quickly shown and the reflection from the original surface, i.e. 020 plane, was completely obliterated within 2 days.

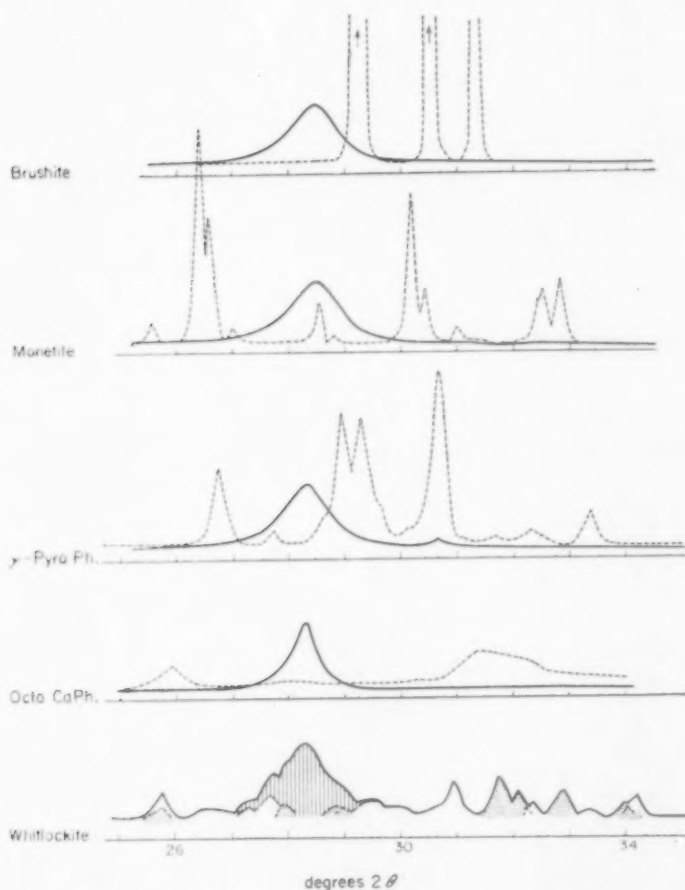
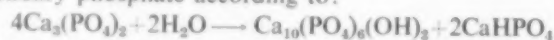


FIG. 5. Diffractometer curves of plaques of several calcium salts after immersion in 2% NaF solution. The dotted curves are obtained from the materials before immersion. The shaded area represents the CaF_2 formed. The stippled area represents F apatite formed.

In most cases powders of the calcium salts were employed in this study. They were ground to pass through a 325 mesh sieve, then mixed with a minimum amount of a thin solution of ethyl cellulose in toluene or xylene and formed on a glass plate into a plaque with a flat surface (1×2 cm) to fit into the specimen holder of the diffractometer. The plaques were suspended in 2% NaF solution usually for about

1 month at room temperature. The ethyl cellulose, though not soluble, can sufficiently swell in water to permit the diffusion of ions to and from the salt grains. Figs. 5-8 show some of the diffractometer curves obtained with the plaques after their immersion. The presence of crystallized calcium fluoride is indicated by the shaded peaks at 28.3° and 47.0° . The dotted curves were obtained from the plaques before immersion.

The reflections of the acid phosphates: brushite, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, monetite, CaHPO_4 , γ -calciumpyrophosphate, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, octocalciumphosphate, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, have completely disappeared. So did those of calcium carbonate (not shown in Fig. 5). Of further interest is the behaviour of the neutral β -tricalcium phosphate, whitlockite, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. We used well crystallized synthetic material made by igniting a calcium phosphate precipitate with $\text{Ca/P} = 1.50$ at 900°C . It reacted strongly with NaF forming CaF_2 . The three low stippled peaks belong to some F apatite formed simultaneously with the fluorite, while the clear peaks belong to some whitlockite which had not yet reacted. This reaction was expected, since it is known (TRAUTZ *et al.*, 1954, 1955) that pure calcium whitlockite is hydrolysed by water into OH apatite and secondary phosphate according to:



On the other hand a synthetic magnesium whitlockite $(\text{Ca,Mg})_3(\text{PO}_4)_2$ containing 4 weight per cent Mg was not transformed by the NaF solution. This again proves

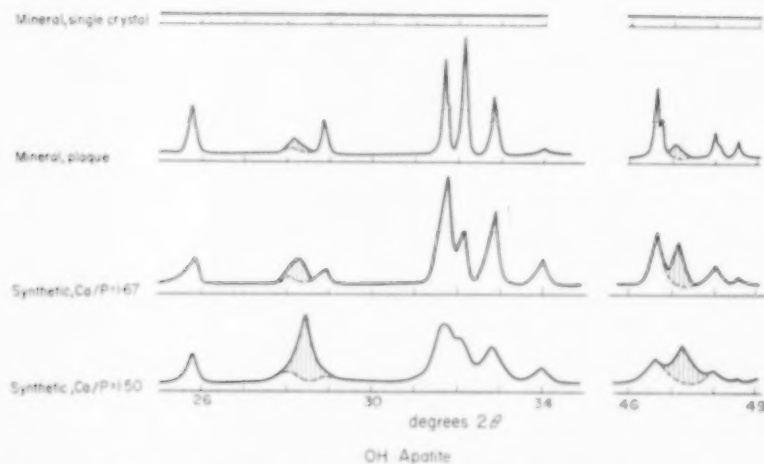


FIG. 6. Diffractometer curves of a single crystal and of plaques of hydroxyl apatite materials (see text) after immersion in 2% NaF solution.

the increased stability of the magnesium whitlockite towards water as compared with the pure calcium salt. Magnesian whitlockite and octocalcium phosphate are components of salivary calculi (TRAUTZ and FESSENDEN, 1958).

Fig. 6 reports the results of experiments with OH apatite materials. On a single crystal of mineral OH apatite from Holly Springs, Georgia, a flat face (2×2 cm)

had been ground which, after 1 month immersion in 2% NaF solution, was mounted in the specimen plane of the X-ray diffractometer. Since the face cut on the crystal was oriented in an arbitrary plane, no apatite reflection was to be obtained from the crystal. As already mentioned, no calcium fluoride reflection was detected either.

A plaque, however, made of the powder of the same mineral revealed after immersion a trace of CaF_2 . Well crystallized synthetic OH apatite made by autoclaving and igniting a calcium phosphate precipitate with $\text{Ca/P}=1.67$, gave a weak report for CaF_2 and a more poorly crystallized precipitate with $\text{Ca/P}=1.50$ showed a medium strong formation of CaF_2 . No doubt, the presence of HPO_4 groups and the resulting strains in the structure make the apatite more reactive.

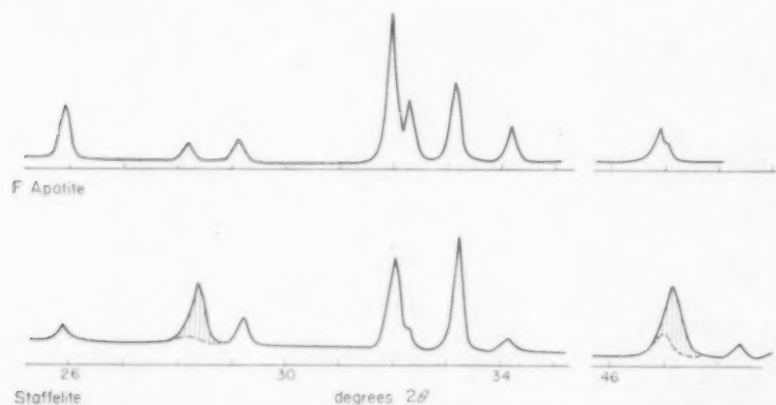


FIG. 7. Diffractometer curves of plaques of F apatite (mineral and synthetic) and of francolite (mineral) after immersion in 2% NaF solution.

Fluorapatite, Fig. 7, is completely resistant to the attack by NaF solution. This result was found with powdered mineral F apatite as well as with synthetic well-crystallized (precipitated and ignited) material. It was therefore quite a surprise to see that plaques made of the well-crystallized mineral francolite (i.e. carbonate fluorapatite) from Staffel, Germany (TRAUTZ, 1955, p. 700) exhibited such a strong formation of CaF_2 . Evidently the carbonate in the apatite is sufficiently accessible to the fluoride that its replacement and the CaF_2 formation can proceed to such an extent.

With a plaque of human dental enamel, Fig. 8, only a weak reaction was observed, while elephant dentine (ivory) proved to be strongly reactive, assumedly due to the smaller crystallite size and its higher content of carbonate and secondary phosphate.

When we now compare the reactivity of the various calcium salts we come to the conclusion that the foremost action of NaF on dental enamel is the replacement of the accessible carbonate and secondary phosphate by CaF_2 . F^- ions may also exchange for OH^- ions in the surface of the apatite crystallites. This surface exchange may proceed for a long time, since the precipitated CaF_2 may supply F^- ions to the fluid diffusing through the enamel. The decomposition of well-crystallized OH apatite

to yield the Ca for the formation of CaF_2 is comparatively slow and of secondary importance. A diffusion of F ions into the interior of the apatite crystallites does not take place (TRAUTZ and FESSENDEN, 1956). A transformation of OH apatite into Fapatite at biological temperatures can happen only by solution and reprecipitation. At high temperatures (900°C), however, diffusion in the solid state proceeds fast enough to make such a transformation possible.

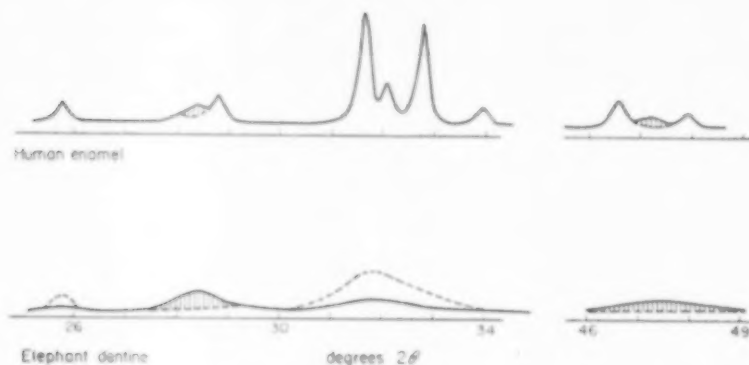


FIG. 8. Diffractometer curves of plaques of enamel and dentine after immersion in 2% NaF solution.

Thus we explain the caries inhibiting effect of topical application of NaF solution on the tooth surface as being due chiefly to the replacement of the accessible carbonate and secondary phosphate, which are most easily soluble in weak acids, by calcium fluoride, which has a very low solubility in acids. This fortification of the enamel against acid solution takes place first of all along the diffusion pathways on which the acid may diffuse into the enamel for its demineralizing attack and on which the mineral salts leave the enamel.

More important than the small amount of carbonate removed is another factor, i.e. the widening of the diffusion channels which accompanies any loss of mineral. The demineralization of the enamel is a self-accelerating process, even if the environmental conditions remain constant. Where a prominent Retzius line reaches the enamel surface, there may be the gateway for the first invasion of acid. A slight demineralization along this path will considerably facilitate further demineralization, if the acid condition persists. Anything which impedes the widening of the diffusion channels is a particularly effective agent for caries prevention.

Acknowledgement—This work was supported in part by a research grant D-159 from the National Institute of Dental Research, and by the Research and Development Division, Office of the Surgeon General Department of the Army, Under Contract No. DA-49-007-MD-765.

REFERENCES

- SCOTT, D. B., PICARD, R. G. and WYCKOFF, R. W. G. 1950. Studies of the action of sodium fluoride on human enamel by electron microscopy and electron diffraction. *Publ. Hlth Rep., Wash.* **65**, 43-46.
- TRAUTZ, O. R. 1951. Progress Report. Public Health Service Research Grant D-36 (C2).
- TRAUTZ, O. R. 1953. The use of X-ray diffraction in dental research. *Ann. Dentist.* **12**, 47-54.
- TRAUTZ, O. R. 1955. X-ray diffraction of biological and synthetic apatites. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **60**, 696-712.
- TRAUTZ, O. R. 1960. Crystallographic studies of calcium carbonate phosphate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **85**, 145-160.
- TRAUTZ, O. R. and FESSENDEN, E. 1956. X-ray and optical observations on fossilized teeth of mastodon and dugong. *Int. Ass. Dent. Res. Preprinted Abstracts No. 103*, p. 41.
- TRAUTZ, O. R. and FESSENDEN, E. 1958. Formation and stability of whitlockite and octocalcium phosphate, two components of salivary calculi. *J. dent. Res.* **37**, 78 (Abstract).
- TRAUTZ, O. R., FESSENDEN, E. and NEWTON, M. G. 1954. Magnesian whitlockite. *J. dent. Res.* **33**, 687.
- TRAUTZ, O. R., FESSENDEN, E. and NEWTON, M. G. 1955. Magnesian whitlockite. *Amer. Crystallographic Ass. Abstracts of the Summer Meeting, June 1955, at Pasadena, Cal.*
- TRAUTZ, O. R., FESSENDEN, E. and ZAPANTA, R. 1959. Effect of sodium fluoride on calcium salts and dental enamel. *J. dent. Res.* **38**, 691.

KRITISCHE BETRACHTUNGEN ZUR CHELATIONSWIRKUNG VON AMINOSÄUREN AUF DEN ZAHNSCHMELZ

A. BREUSTEDT

Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Zusammenfassung—Es wird nachgewiesen, dass Aminosäuren im basischen Milieu *in vitro* das Calcium des Hydroxylapatits nicht innerkomplex zu binden vermögen, wie es Schatz bei seiner Proteolyse-Chelationstheorie für die Cariesentstehung voraussetzt. Nur Glutaminsäure und Asparaginsäure zeigen im sauren Bereich ein stark ansteigendes Lösungsvermögen, das aber nicht von der Aminogruppe abhängig ist, da einfache Dikarbonsäuren dasselbe Verhalten zeigen.

Abstract—According to the chelation theory of Schatz, before proteolytic activity can commence in the mouth, the calcium of the hydroxyl-apatite of the tooth substance must be dissolved. Like other nitrogenous compounds, amino-acids have this power of chelating. From the chemistry of complexes, however, it is known that the stability of the inner bonds of the complex of amino acids with heavy metals is much greater than those between amino acids and the alkaline metals. Normally, no such amino-acid-calcium complexes are formed since calcium has a greater affinity for acids than for nitrogen. These reactions were studied by *in vitro* experiments with amino acids and pulverized tooth enamel. Neither acid nor basic environment could cause the formation of an amino-carbonic acid-calcium complex. Yet, the number of carboxyl groups present is of great importance to the solubility coefficient of calcium. This explains the ability of ethylene-diamine tetra-acetate (EDTA) to form complexes. The behaviour of EDTA conformed, in every case, to this inference. Only the mono-amino dicarbonic acids (glutamic acid, aspartic acid) can, in an acid environment, dissolve greater amounts of hydroxyl-apatite. These properties are completely independent of the amino-groups; the simple di-carbonic acid will dissolve exactly the same amount of hydroxyl-apatite. The results of these experiments suggest, therefore, that proteolysis cannot produce any substance which will cause chelation in the way Schatz has suggested. The solubility of hydroxyl-apatite in glutamic and aspartic acid is, however, much greater. Thus the action of the amino acids seems to be more in accord with the acid rather than the proteolytic theory of caries.

Résumé—Selon l'opinion de Schatz les agents de chélation issus de processus catalytiques protéolytiques dans la bouche sont aptes à dissoudre le calcium de l'hydroxylapatite du complexe dur de la dent. Parmi les liaisons azotées on trouve des acides aminés. On sait que la stabilité de ces liaisons internes des complexes avec les acides aminés diminue fortement des métaux lourds jusqu'aux alcalino-terreux. Ainsi normalement on ne connaît aucun de ces complexes car le calcium a une affinité bien plus grande pour l'oxygène que pour l'azote. On peut démontrer ce fait par des expériences *in vitro* où on utilise des acides aminés et de l'émail pulvérisé. Les acides aminomonocarbonés ne se combinent avec le calcium ni en milieu acide ni en milieu basique. Cependant le nombre de groupements carboxyle d'une combinaison est très important pour la dissolution du calcium. On comprend bien ainsi l'aptitude de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) à faire ces complexes. Mais on ne peut en aucun cas tirer des qualités de l'EDTA de conclusions plus générales. En fait les acides monoamino dicarbonés (acide glutamique, acide asparaginique) peuvent,

mais en milieu acide seulement, dissoudre des quantités importantes d'hydroxyapatite. Les groupes amines ne sont ici d'aucun intérêt car l'acide dicarbonique a le même pouvoir dissolvant. L'expérience montre que la protéolyse ne produit aucune substance utilisable dans le sens de Schatz. De ce fait puisque le pouvoir de l'acide glutamique et de l'acide asparaginique augmente en milieu acide vis-à-vis de l'hydroxyapatite, la théorie acidophile semble plus vraisemblable que la théorie protéolytique.

IN DEN LETZTEN JAHREN ist sowohl in den Arbeiten von A. Schatz und seinen Mitarbeitern als auch in den Veröffentlichungen von Eggers Lura der Chelation eine wesentliche Bedeutung für die Entstehung der Caries beigemessen worden. Es erübrigt sich, auf die chemische Seite des Chelationsvorganges einzugehen, da sie in verschiedenen Arbeiten (SCHATZ und MARTIN, 1959a, b; SCHATZ, MARTIN und SCHATZ, 1958; EGGERS LURA, 1957; WANDEL, 1959) beschrieben wurde. Das Wesen dieses Vorganges besteht kurz zusammengefasst darin, dass vor allem gewisse organische Verbindungen, sogenannte Chelatoren oder Donatoren mit Metallen innere Komplexe bilden können, die sich durch eine grosse Stabilität auszeichnen, weil durch koordinative Covalenzen geschlossene Ringstrukturen entstehen. Die Chelatoren sollen nach der Ansicht von A. Schatz vor allem durch proteolytische Vorgänge in der Mundhöhle entstehen. Es müsste sich deshalb vorwiegend um stickstoffhaltige Abbauprodukte, unter anderem auch um Aminosäuren handeln.

Da wir seit einiger Zeit Untersuchungen über die freien Aminosäuren in der Mundhöhle durchführen, lag es nahe, uns auch über deren Bedeutung als Chelatoren für die Zahnhartsubstanzen im Sinne von A. Schatz zu unterrichten.

Die Angaben hierzu im Schrifttum sind spärlich. A. Schatz weist verschiedentlich darauf hin, dass Aminosäuren und andere Eiweiss-Abbauprodukte unter gewissen Bedingungen eine lösende Wirkung auf den Hydroxylapatit des Zahnes ausüben können. Gelegentlich wurden Glycin, Alanin, Serin, Glutaminsäuren und Asparaginsäuren als geeignet für eine Komplexbildung mit Ca erwähnt, ohne aber genaue Angaben zu machen. In einer Arbeit (MARTIN *et al.*, 1954) wird eine Tabelle angeführt (Tab. 2), anhand der sie beweisen wollen, dass alle dabei getesteten Stoffe Zahnhartsubstanz in unterschiedlichem Ausmasse entkalken können. Danach erweisen sich die Citrate neben der in der Natur nicht vorkommenden Äthylendi-aminetraessigsäure (EDTA) als die aktivsten zahnlösenden Substanzen. Von den Aminosäuren soll vor allem DL-Serin wirksam sein.

Bekanntlich gelingt es mit der EDTA innerhalb weniger Tage, einen Zahn bei einem pH von über 7 vollkommen zu entkalken. Daher erhebt sich die Frage, ob die in der Mundhöhle vorkommenden Aminosäuren überhaupt eine ähnliche Wirkung wie die synthetische EDTA, die eine stickstoffhaltige organische Säure darstellt, hervorrufen können. Zu diesem Zwecke wurden von uns die wichtigsten Aminosäuren *in vitro* auf ihre schmelzlösende Wirkung gleicher Weise getestet, wie es von Schatz und Eggers Lura mit verschiedenen anderen Substanzen vor einiger Zeit durchgeführt wurde. 200 mg feingemahlenes Schmelzpulver von gleicher Korngrösse wurden mit den verschiedenen Aminosäuren (10 m Mol auf 50 ml Aqua dest) in ein Reagenzglas gebracht und 10 Tage bei 37° aufbewahrt. Der pH-Wert aller Lösungen lag im basischen Bereich und wurde vor Beginn und nach Abschluss des Versuches

nachgeprüft. Zur Neutralisation wurde NH_4OH verwendet, um die Calciumbestimmung mit dem Flammenphotometer nicht durch Na^+ oder K^+ zu erschweren. Bakterienwachstum wurde durch 3 Tropfen CHCl_3 verhindert.

TABELLE 1. DAS LÖSUNGSVERMÖGEN VON AMINOSÄUREN FÜR CALCIUM AUS PULVERISIERTER ZAHNHARTSUBSTANZ IM ALKALISCHEN MILIEU

Testsubstanz (10 mM auf 50 ml Aq. bidest)	pH (nach 10 Tg.)	mg Ca (gelöst in 50 ml H_2O)
Glycin	7,2	1,90
DL-Alanin	7,6	1,84
DL- α -Aminobuttersäure	7,7	1,55
DL-Leucin	7,8	1,50
DL-Isoleucin	7,4	1,63
L-Prolin	8,0	1,25
DL-Tryptophan	7,7	1,72
DL-Serin	7,8	1,76
DL-Methionin	7,7	1,10
L-Cystin	7,8	1,05
Taurin	7,5	1,80
L-Asparaginsäure	7,6	1,60
L-Glutaminsäure	7,9	1,46
Citronensäure	7,4	7,5
EDTA	8,0	23,2
Aqua bidest	7,8	0,55
Perchlorsäure	7,8	1,22

TABELLE 2. VERGLEICH DER ERGEBNISSE VON A. SCHATZ MIT DEN EIGENEN

"Chelator"	Schatz		eig. Ergebnisse	
	pH nach 7 Tg.	mg Ca gelöst in 50 ml	pH nach 10 Tg.	mg Ca gelöst in 50 ml
DL-Asparaginsäure	8,2	0,37	7,6	1,60
Taurin	8,36	1,15	7,5	1,80
DL-Serin	8,14	2,29	7,8	1,75
Citronensäure	8,87	7,90	7,4	7,5
EDTA	8,46	63,8	8,0	23,2
Aqua dest	8,78	0,017	7,8	0,55

Nach Ablauf der Versuchszeit wurde der ungelöste Rückstand mit einer feinen Glasfritte abgesaugt und der Calciumgehalt der Lösung mittels Flammenphotometer bestimmt (Tab. 1). Die Versuche wurden mehrere Male wiederholt, um die gefundenen Ergebnisse zu bekräftigen.

Im Gegensatz zu Schatz und Eggers Lura liessen sich innerhalb der verschiedenen Aminosäuren bei einem basischen pH-Wert keine signifikanten Unterschiede feststellen, die etwa ihrer unterschiedlichen chemischen Konstitution gerecht werden könnten, so dass sich weder das angeblich gute Lösungsvermögen von Serin, noch der Unterschied zwischen Asparaginsäure und Serin bestätigten. Vielmehr liessen die Vergleichswerte von Perchlorsäure, die nicht in der Lage ist, Komplexe zu bilden, bei annähernd gleichem basischen pH erkennen, dass es sich nur um einen einfachen Lösungsvorgang und nicht um eine Komplexbildung handeln kann.

Dagegen ergab sich im Verhalten der Citronensäure und der EDTA eine relative Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schatz und Eggers Lura.

Da Schatz aus seinen Untersuchungen die Schlussfolgerung zog, dass auch die getesteten Aminosäuren in mehr oder weniger starkem Ausmass Zahnmaterial bei basischem pH entkalken und eine Chelationswirkung auf den Hydroxylapatit ausüben können, unsere Werte dies aber nicht bestätigten, erhebt sich die Frage nach einer Klärung dieses Widerspruches.

Es ist lange bekannt, dass die Stabilität der Innerkomplexverbindungen von Aminosäuren mit Metallen, wie Cu, Co, Cr, Fe, Ni, Pt und Zn, die sehr gute Komplexbildner darstellen, bis zu den Erdalkalimetallen mit Calcium am Ende stark abnimmt, von dem normalerweise so gut wie keine Komplexe bekannt sind. Dies ist sogar sehr zweckmässig, denn sonst würde ja der Zahnschmelz, der durch den Speichel und die Nahrung den verschiedensten komplexbildenden Substanzen ständig ausgesetzt ist, sehr leicht der Zerstörung anheimfallen. Trotzdem besteht bei bestimmten Substanzen von besonderer chemischer Struktur die Möglichkeit einer Komplexbildung mit Calcium.

Nach Sidgwick hat Ca eine stärkere Affinität zu Sauerstoff als zu Stickstoff. Deshalb können organische Substanzen vor allem mit Carboxylgruppen eher stabile Komplexe mit Ca als etwa Verbindungen mit NH_2 -Gruppen bilden. Die Bildung von Komplexen wäre bei Aminodicarbonsäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) noch eher möglich, als bei Aminomonocarbonsäuren, während von Calcium mit Diaminocarbonsäure (etwa Arginin), mit Amidn der Aminosäuren (Glutamin, Asparagin) und Aminen keine stabilen inneren Komplexe bekannt sind.

Diese Feststellung ist von Bedeutung, denn sie steht im Widerspruch zu den Ansichten von A. Schatz und Eggers Lura, die betonen, dass Amine und Amide ebenfalls als Chelatoren für Ca in Frage kommen.

Wesentlich günstiger als bei den Dicarbonsäuren wird dagegen die komplexbildende Wirkung bei den Tricarbonsäuren, etwa der Citronensäure oder der in der Technik bekannten Nitriloessigsäure $\text{N}=(\text{CH}_2\text{COOH})_3$ oder gar bei der 4-basischen EDTA.

Die Neigung der EDTA zur Bildung von Innerkomplexen ist so gross, dass die üblichen Nachweisreaktionen auf Ca^{++} , wie Sulfat-, Carbonat- und Oxalatbildung gar nicht mehr durchführbar sind.

Diese ausgesprochen starke Neigung des EDTA zur Bildung von Innerkomplexen beruht vor allem auf dem Vorhandensein von Carboxylgruppen, wodurch im Verein mit den beiden Stickstoffatomen ein 6-zähliger Chelator entsteht.

Durch die Bildung vieler Nebenvalenzringe wird die Stabilität des Komplexes so gesteigert, dass die starke schmelzlösende Wirkung nicht verwundert. Deshalb dürfen aus der komplexbildenden Wirkung der EDTA auf keinen Fall Schlussfolgerungen über die Wirkung anderer Verbindungen, etwa der gewöhnlichen Aminosäuren, gezogen werden.

Von Schatz wurde wiederholt betont, dass der Chelationsvorgang sowohl im sauren als auch im neutralen oder basischen Milieu erfolgen kann. Bei dieser Reaktion soll Calciumphosphat "unter Bedingungen aufgelöst werden, bei denen der pH-Wert von sekundärer Bedeutung ist". Da jedoch das Lösungsverhalten Schwankungen des gelösten Kalzium in Abhängigkeit vom pH-Wert aufweist, wurde das Lösungsvermögen von Aminosäuren auf Zahnschmelz in pH-Bereichen von 3–9 untersucht. Das Ergebnis zeigt die Abb. 1. Es ist eine bekannte Tatsache, dass mit

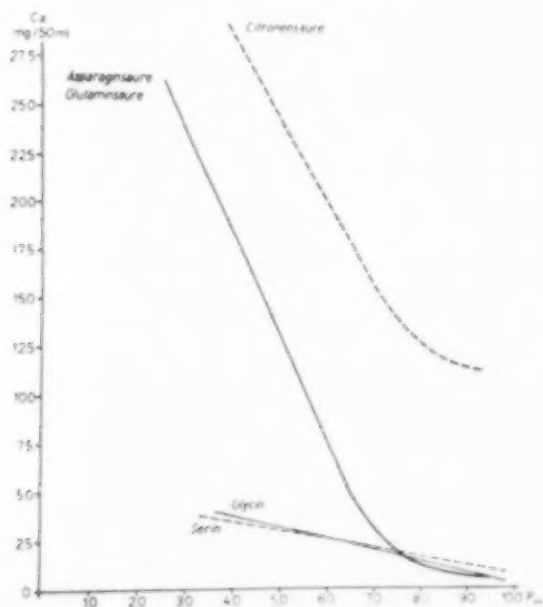


Abb. 1. Das Lösungsverhalten von Aminomonocarbonsäuren (Glycin, Serin) und von Aminodicarbonsäuren auf das Calcium des Hydroxylapatits von Zahnhartsubstanz im pH-Bereich von 3–9.

abnehmenden pH-Wert die Löslichkeit des Hydroxylapatits zunimmt. Bei Aminomonocarbonsäuren, wie Glycin, Serin, Cystin ist das Lösungsverhalten von Hydroxylapatit annähernd gleich einer Kontrollprobe mit Perchlorsäure von gleichem pH-Wert.

Von einer Chelationswirkung der Aminomonocarbonsäuren kann also weder im basischen noch im sauren Bereich die Rede sein.

Auffallend ist dagegen die lösende Wirkung der Aminodicarbonsäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure). Während sie im basischen Bereich keinen wesentlichen Unterschied zu den übrigen Aminosäuren aufweisen, steigt ihr Lösungsvermögen mit sinkendem pH-Wert in auffallender Weise an. Es erhebt sich die Frage nach den Ursachen dieses Verhaltens der Glutaminsäure und Asparaginsäure. Ist es eine Eigenschaft, die den beiden Carboxylgruppen zuzuschreiben ist, oder kommt es zur Bildung von inneren Komplexen mit der NH_2 -Gruppe?

Da jedoch das Lösungsverhalten anderer Dicarbonsäuren, wie α -Ketoglutarinsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Adipinsäure den gleichen Kurvenverlauf aufweist, kann der Aminogruppe keine Bedeutung für das verstärkte Lösungsvermögen der Glutaminsäure und Asparaginsäure auf den Hydroxylapatit beigemessen werden. Vielmehr sind die beiden Carboxylgruppen allein dafür ausschlaggebend.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die im Speichel vorkommenden Aminosäuren unter den gegebenen Bedingungen nicht zur Chelation mit dem Calcium des Hydroxylapatits der Zahnhartsubstanz geeignet sind, wie dies A. Schatz für möglich hält. Jedoch haben die Aminodicarbonsäuren die Fähigkeit, im sauren Bereich auch unter den Bedingungen, wie sie im Speichel vorliegen, Zahnhartsubstanzen verstärkt zu lösen.

Auf diese Weise lassen sich vielleicht die Beobachtungen von ATKINSON und MATHEWS (1949) und ARMSTRONG und ATKINSON (1953) erklären, die im kariösen Dentin vermehrt Glutamin- und Asparaginsäure feststellten. Nach KIRCH *et al.* (1947) und FOSDICK und BLACKWELL (1949) und in neuester Zeit nach WANDELT (1960) sollen im Speichel von kariesanfälligen Patienten diese beiden Aminodicarbonsäuren vermehrt vorkommen.

Die Glutaminsäure nimmt ausserdem eine zentrale Stellung im intermediären Stoffwechsel ein und steht über die α -Ketoglutarinsäure in enger Beziehung zum Citronensäurezyklus und damit zum Kohlenhydratstoffwechsel.

Es ist das Kennzeichen einer wertvollen neuen Theorie, wie sie die Proteolyse-Chelations-Theorie von Schatz zweifellos darstellt, dass sie versucht, dem neuesten Stand der Erkenntnisse gerecht zu werden. Es ist das unvergängliche Verdienst von A. Schatz, dass er neue Gesichtspunkte, die in der modernen Biochemie eine grosse Rolle spielen, in die Kariesforschung getragen hat und damit dem Denken und Forschen neue Wege gewiesen hat. Nun müssen die von Schatz aufgestellten Thesen einer kritischen Nachprüfung unterzogen werden. Für die in der Mundhöhle vorkommenden Aminosäuren muss auf Grund unserer Ergebnisse jedoch festgestellt werden, dass sie unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Lage sind, mit dem Ca des Hydroxylapatits weder im basischen noch im sauren Bereich stabile innere Komplexe zu bilden.* Dies entspricht vollkommen der aus der Komplexchemie bekannten Tatsache, dass die Neigung des Calciums, mit stickstoffhaltigen Verbindungen Chelate zu bilden, äusserst gering ist, wenn nicht durch andere günstig wirkende Gruppen, wie Carboxylgruppen geeignete Voraussetzungen geschaffen

* Diese Feststellung konnte durch Leitfähigkeitsmessungen bestätigt werden (im Druck).

werden. Da die bei der Proteolyse auftretenden Abbauprodukte vorwiegend stickstoffhaltig sind, kann die Proteolyse mit den bisher bekannten Verbindungen für Calcium keine geeigneten Chelatoren liefern, so dass der bisher noch nicht bewiesene Vorgang "Proteolyse-Chelation" als fragwürdig erscheinen muss. Da jedoch Substanzen, wie die Citronensäure, die mehrere Carboxylgruppen und statt Aminogruppen Oxygruppen besitzen, eine Chelationswirkung auf Calcium ausüben und ihr Lösungsvermögen im sauren pH-Bereich ansteigt, sind geeignete Substanzen, vor allem unter den Abbauprodukten der Kohlenhydrate zu vermuten. Es bietet sich dabei die Schlussfolgerung an, die Komplexbildung noch mit der Säurewirkung zu verbinden, wie der Kurvenverlauf für Citronensäure (Abb. 1) zeigt, so dass die Säuretheorie entgegen der Ansicht von Schatz auch unter Berücksichtigung der Chelationswirkung gegenüber der Proteolysetheorie beweiskräftiger bleibt.

LITERATUR

- ARMSTRONG, W. G. und ATKINSON, H. F. 1953. An investigation into the acids components of the carious dentin. *Brit. dent. J.* **95**, 8.
- ARMSTRONG, W. G. und MATTHEWS, E. 1949. An investigation into the organic components of the human tooth. A study of sound and carious dentin. *Brit. dent. J.* **86**, 167-171.
- ATKINSON, H. F. und MATTHEWS, E. 1949. Studies on human dentin. *Nature, Lond.* **163**, 373.
- EGGERS LURA, H. 1957. Die nicht-sauren Wirkstoffe in der Kariespathogenese. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **12**, 806-811.
- FOSDICK, L. S. und BLACKWELL, R. Q. 1949. The determination of amino acid content of fresh and putrefied saliva by paper partition chromatographie. *J. dent. Res.* **28**, 644.
- HEIN, F. 1950. *Chemische Koordinationslehre*. Verlag Hirzel, Leipzig.
- KIRCH, E. R., KESEL, R. G., O'DONELL, I. F. und WACH, E. G. 1947. Amino acids in human saliva. *J. dent. Res.* **26**, 297.
- LEVINSKAS, G. J. und NEUMAN, W. F. 1954. The solubility of bone mineral—I. Solubility studies of synthetic hydroxylapatite. *J. phys. Chem.* **59**, 164-168.
- MARTELL, A. E. und CALVIN, M. 1958. *Die Chemie der Metallchelateverbindungen*. Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstr.
- MARTIN, J. J., ISENBERG, H. D., SCHATZ, V., TRELAWNY, G. S. und SCHATZ, A. 1954. Chelation or metal-binding as a new approach to the problem of dental caries. *Euclides* **14**, 881-891.
- SCHATZ, A. und MARTIN, J. J. 1959a. Opportunities for creative research in dental caries. *N.Y. St. Dent. J.* **29**, 5-10, 47-53.
- SCHATZ, A. und MARTIN, J. J. 1959b. Concerning criticism of the proteolysis-chelation theory of dental caries. *N.Y. St. Dent. J.* **25**, 285-293.
- SCHATZ, A., MARTIN, J. J. und SCHATZ, V. 1958. Quelques considerations sur la carie dentaire en fonction de la théorie de proteolyse-chélation. *Rev. belge Sci. dent.* **13/14**, 538-557.
- WANDELT, S. 1959. Über die Wirkung von Chelatoren auf die Zahnhartsubstanz. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **14**, 17, 1253-1270.
- WANDELT, S. 1960. Eiweissabbauprodukte als Chelatoren und ihre möglichen Beziehungen zur Zahnkaries. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **15**, 376-379.

AN INVESTIGATION INTO THE RELATION BETWEEN THE SIALIC ACID OF SALIVA AND DENTAL CARIES

H. EGGERS LURA

Holbæk, Denmark

Abstract—Saliva from eighteen persons some of whom were caries resistant and some caries active was examined by the Bial-method for the content of sialic acid. Significant differences in the two groups were found in the mixed saliva while pure submaxillary (or parotid) saliva showed no significant differences. The hydrolysis of the material seems to be easier in the caries active persons. The presence of sialic acid in the plaques was confirmed. The chelating effect of a mucin-sugar solution at neutral pH could be histologically demonstrated. The addition of sugar to the salivary mucin increases the content of sialic acid.

Zusammenfassung—Speichelmateriale von 18 Personen, die teils kariesaktiv, teils kariesresistent waren, wurden durch die Bialmethode auf den Gehalt an Sialinsäure untersucht. Signifikante Unterschiede in den zwei Gruppen wurden in dem gemischten Speichel gefunden, während reiner Submaxillaris-oder Parotisspeichel keine signifikante Unterschiede aufwies. Die Hydrolyse des Versuchsmaterials scheint leichter bei den Kariesaktiven als bei den Kariesresistenten vor sich zu gehen. Das Vorkommen der Sialinsäure im Plaquematerial wurde bestätigt. Die chelierende Eigenschaft einer Muzin-Zuckerlösung bei neutralem pH konnte histologisch nachgewiesen werden. Histologische Schnitte von Zähnen, die mit Muzin und Rohrzucker oder anderen komplexbildenden Stoffen behandelt worden waren, verrieten eine grosse Ähnlichkeit mit Schnitten von klinisch kariösen Zähnen und mit Zähnen, die bei gewissen Formen von hormonaler Beeinflussung gestört worden waren. Der Zusatz von Zucker zu dem Speichelmuzin erhöht den Gehalt an Sialinsäure. Einige Verfasser haben durch Papierchromatographie eine unbekannte organische Säure in Mischungen von Speichel und Zucker gefunden. Möglicherweise ist diese Säure identisch mit der Sialinsäure.

Résumé—Des échantillons de salive de 18 personnes, en partie sujettes, en partie résistantes à la carie ont été examinées selon la méthode de Bial sur le contenu d'acide sialinique. Des différences significatives entre les deux groupes furent trouvées dans la salive mixte, mais pas dans la salive prélevée des glandes submaxillaires ou de parotis. L'hydrolyse de la sialomucine humaine semble avoir plus facilement chez les personnes sujettes à la carie que chez les personnes résistantes à la carie. La teneur en acide sialinique dans les plaques dentaires fut également confirmée. La faculté chélatante d'une solution de mucine et du sucre au pH neutre pouvait être démontrée par des méthodes histologiques. Des sections histologiques des dents qui étaient traitées avec de la mucine et du sucre ou avec d'autres substances chélatantes montraient une grande ressemblance avec les sections de vraie carie, et aussi avec les dents détruites par influence hormonale. L'addition de sucre à la mucine humaine augmente la teneur en acide sialinique. Quelques auteurs ont trouvé au moyen de chromatographie de papier un nouvel acide inconnu dans des mélanges de sucre et de salive. Peut-être cette acide est identique avec l'acide sialinique.

INTRODUCTION

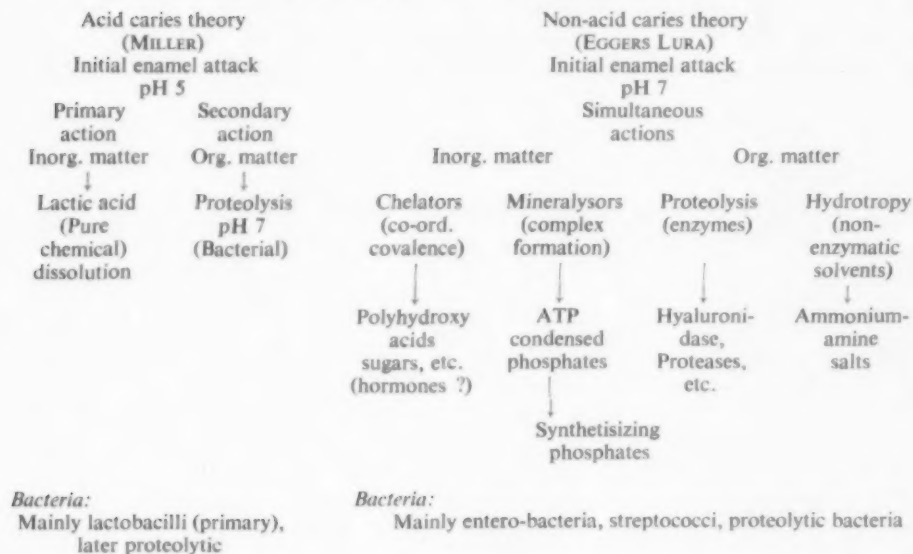
THE BIOCHEMICAL composition of the salivary mucin has for a long time remained unknown, but recently it seems to have attracted much interest from research workers (KNOX and STILL, 1953; IRWIN and LEAVER, 1957; BERGGAARD and WERNER, 1958). The importance of the salivary mucin to the caries processes has formerly been indicated by the present author (EGGERS LURA, 1957). A great part of the acids formed by the bacterial breakdown of the oral carbohydrates no doubt contributes to the precipitation of the salivary mucin on the tooth surfaces, resulting in plaque formation. However, the acid-forming faculty of the plaque itself has been the object of very diverging opinions (STRÄLFORS, 1950; MILLER, MUNTZ and BRADEL, 1940; ENGLANDER, CARTER and FOSDICK, 1956; FROSTELL and RHODIN-BLOMBERG, 1957; TOVERUD and HAGEN, 1957). It is a fact that caries lesions frequently start under the plaque, but if we examine the plaque material from caries-resistant and caries-active persons we generally find no significant differences in the acid formation (EGGERS LURA, 1958). In many cases the acid formation may even be greater in the salivary and the plaque material from caries resistant persons.

However, it has been pointed out by the author as early as in 1949 (EGGERS LURA, 1949) that the enamel can be demineralized without any acid action by means of biochemical processes similar to those involved in the physiological milk tooth resorption. The chelation mechanism whose importance to the caries picture was emphasized 5 years later by Schatz and co-workers in 1954 is only a single non-acid biochemical process involved in the physiological milk tooth resorption and in the caries process. Schatz and his co-workers are quite aware of this fact (MARTIN, KARLSON and SCHATZ, 1956). The bacterial action of mineralysis by ATP and nucleic acids, etc., the hydrotropic action and the bacterial synthetisizing phosphatase effect are some other non-acid mechanisms which may influence the caries picture. These mechanisms have formerly been described by the author in various papers and it has been emphasized that their occurrence in the caries picture is more probable than the acid mechanism (EGGERS LURA, 1958) and that they go hand in hand with the chelation mechanism during the bacterial utilization and digestion of the hard tooth tissues (Table 1) (EGGERS LURA, 1961).

If the salivary mucin of the dental plaque appears to contain chelating or complexing, mineralysing substances in different quantities in caries-resistant and caries-active persons, this fact may possibly serve to elucidate the caries etiology in a quite new way.

The purpose of the following experiments has been to examine for the presence of a chelating carbohydrate substance in the saliva of caries-resistant and caries-active persons, named sialic acid. It is a ring-shaped polyhydroxy acid which has been investigated in recent years at the University of Uppsala in Sweden (BLIX, 1948; WERNER and ODIN, 1952). Possibly also other chelating or complexing sugar constituents of the salivary glucoproteins, as for instance hexosamine, hexose (galactose, mannose) and fucose (a pentose) may be important in this connexion and they will be investigated later by the present author.

TABLE 1. THE TWO PRINCIPAL CARIES THEORIES



MATERIAL AND METHODS

The classifying of the material was performed according to the criteria used by the author in former salivary investigations and included: (1) an absolute caries-resistant group (C-R), (2) a questionable resistant group (C-R ?) and (3) an absolute caries-active group (C-A). The saliva was collected from the author's practice patients 2 hr after the last meal and in such a way that Stenson's duct was covered by cotton-rolls resulting preferably in the flow of submaxillary and sublingual saliva, because this saliva is more rich in sialo protein than the parotid saliva (BERGGARD and WERNER, 1958).

The saliva was stimulated and when about 3 ml were excreted in the mouth they were absorbed by means of a syringe and placed in the test tubes for immediate analysis. The deproteinizing was made either by addition of 1 ml of 5% trichloroacetic acid to 2 ml saliva or by washing of the saliva with 95% ethanol. After removing of the trichloro or the ethanol 1 ml of precipitated glucoprotein material was used for hydrolysis, 4 ml of distilled water, 3.5 ml of orcinolreagent (0.5 g orcinol+200 ml concentrated hydrochloric acid+50 ml water) and 0.5 ml of a 1/150 N ferric chloride solution in hydrochloric acid of the same strength as the orcinol reagent being added. The mixture was boiled in liquid paraffin at 108°C for 10 min or in boiling water for 15 min and then 5 ml iso-amylalcohol were added after cooling. After centrifuging, the clear supernatant contains the extracted colour which is dark violet. It is measured at 570 m μ in a Beckman spectrophotometer against a blank containing the reagents.

As pure sialic acid for standard is difficult to obtain the values were calculated according to the extinction curves in the papers of the Swedish authors in which either pure sialic acid or orosomucoide was used for standard (0.2 mg/ml sialic acid correspond to 1.8 mg/ml serummucoide).

RESULTS

Experiment No. 1

TABLE 2. THE CONTENT OF SIALIC ACID IN MIXED SALIVA

Test No.	State of caries	Sialic acid (mg per cent)
1	C-A	18.4
2	C-A	16.2
3	C-A	22.8
4	C-A	25.4
5	C-A	15.2
6	C-A	17.9
7	C-A	20.2
8	C-R ?	10.1
9	C-R ?	5.7
10	C-R ?	13.1
11	C-R	10.4
12	C-R	9.8
13	C-R	8.8
14	C-R	7.6
15	C-R	11.9
16	C-R	5.8
17	C-R	6.6
18	C-R	10.8

Total mean=13.1. Mean of C-A and C-R=13.8. C-A (M)=19.4. $\delta=3.6$. $\delta_{M_1}=1.3$. C-R (M)=8.95. $\delta=1.7$. $\delta_{M_2}=0.5$. The differences of the two groups (C-A and C-R) must be regarded as significant because: $M_1 - M_2 > 3 \cdot \sqrt{(\delta_{M_1}^2 + \delta_{M_2}^2)}$; $10.5 > 3 \cdot 1.4$.

Some further experiments were made with pure stimulated submaxillary saliva from C-A and C-R material. These experiments generally showed higher values of sialic acid both in the C-A and the C-R material and the differences of the two groups were not significant. The hydrolysis of the salivary mucin and the deliberation of the sialic compound, however, seems to be faster in the caries-active material in which the sialic acid possibly is more loosely bound and the depolymerization of the mucoids easier. Some few orientating experiments were performed on plaque material of C-A persons. The plaque material was suspended in 1 ml water and the analysis made in the same way as with the saliva. The demonstration of sialic acid in the plaque material was positive, but was disturbed by other colour developments. A better technique therefore must be devised for this purpose.

Experiment No. 2. The demineralizing effect of the mucin at neutral pH

In a 1-2% solution of pure human or oxen mucin+20% sucrose solution+1-2% alanin solution in an ammonium buffer pH 7.8 a fresh extracted tooth with "wax-window" was placed. The pH was adjusted by renewing the solvents every day for a fortnight, then the tooth was placed in 10% formalin and histologic sections made. In some cases the effect was increased by means of the addition of 1 ml parate hormone (Henning) and 5% nucleic acid. The use of the alanin-sugar containing mixture to mucin produces a distinct enamel decalcification which is characterized by the solution of the inorganic salts under the enamel surface in the interprismatic substance, while the organic substances seem to be more resistant. The histologic picture in many cases is similar to the clinical caries picture or to the demineralization caused by EDTA or parathyroid hormone, ATP and nucleic acid (EGGERS LURA, 1958) and also to the enamel demineralization which may be observed by certain forms of hypopituitarism and which have been described previously by MAJ and BASSI (1943).

Experiment No. 3. Increasing of the sialic content in saliva by sugar addition

To 2 ml submaxillary saliva 100 mg sucrose are added and incubated 4-8 hr at 37°C. A further 2 ml saliva from the same person is used without sugar as control. Afterwards the analysis of sialic acid is performed on both tests. The content of sialic acid is increased very much in all the sugar tests. So the mixture of sugar and mucin seems to increase the formation of sialic acid.

DISCUSSION

In the mixed saliva from C-A and C-R persons distinct differences of the content of sialic acid could be demonstrated, indicating that this polyhydroxy acid or its salts may have some significance in the caries picture. The same is indicated by its presence in plaque material, by the demineralizing effect of the mucin at neutral pH and by the increase of the sialic acid by addition of sugar. As both the saliva and the plaques normally have a neutral reaction it is difficult to imagine a direct acid effect with this acid on the tooth surface. On the other hand it is possible that certain bacteria may utilize the sialic acid or the sialic salts to chelating processes in the plaque, because most of the hydroxysalts have a strong chelating complex effect and because most of the bacteria need inorganic calcium phosphate to thrive. Possibly also a certain hormone effect plays a role in this picture as observed by the histologic experiments. A hormonal influence upon the caries picture has been observed by several authors in recent years (BIXLER, MUHLER and SHAFER, 1957; GRÖNROOS and RAUMA, 1960). Recently STRÄLFORS and ERICSSON (1959) have demonstrated by means of paper chromatography that an acid is formed in bacterially fermented sugar which is not identical to lactic acid or other acids formed by bacteria. Possibly this acid is the sialic acid ($C_{14}H_{24}O_{11}N$).

REFERENCES

- BERGGARD, I. and WERNER, I. 1958. The carbohydrate constituents of human saliva. *Acta odont. scand.* **16**, 43-50.
- BIXLER, D., MUHLER, J. and SHAFER, W. 1957. Histology of thyroid and salivary glands. *J. dent. Res.* **36**, 571-575.
- BLIX, G. 1948. Biochemistry of mucopolysaccharides. *Acta chem. scand.* **2**, 467-510.
- EGGERS LURA, H. 1949. *Die Enzyme des Speichels und die Zähne*. p. 64. Hanser Verlag, München.
- EGGERS LURA, H. 1957a. Non-acid agents in caries. *Odont. Revy* **8**, 169-176.
- EGGERS LURA, H. 1957b. Nicht-saure Wirkstoffe in Karies. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **12**, 806-811.
- EGGERS LURA, H. 1958a. Die Säurebildung im Speichel und Plaque. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* **28**, 447-455.
- EGGERS LURA, H. 1958b. Mikrobiol. Mechanismen in Karies. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **13**, 878-883.
- EGGERS LURA, H. 1958c. Experimentell Schmelzentkalkung bei neutralem pH. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **13**, 1333-1335.
- EGGERS LURA, H. 1961. Biochemical analogy between resorption and caries. *N.Y. St. dent. J.* **27**, 75-79.
- ENGLANDER, H. R., CARTER, W. J. and FOSDICK, L. S. 1956. Formation of lactic acid in dental plaques—III. *J. dent. Res.* **35**, 792-799.
- FROSTELL, G. and RHODIN-BLOMBERG, R. 1957. Acid formation in plaque. *Svensk tandläk. Tidsk.* **50**, 407-420.
- GRÖNROOS, M. and RAUNA, E. 1960. Einfluss einiger Hormone auf Rattenkaries. *Finska Tandläk. Sällsk. Förh.* **56**, 1-8.
- IRWIN, M. and LEAVER, A. G. 1957a. Biochemistry of human salivary mucin. *J. dent. Res.* **36**, 100-103.
- KNOX, K. W. and STILL, J. L. 1953. Observation on salivary mucoids. *J. dent. Res.* **32**, 379-385.
- MARTIN, J. H., ISENBERG, V., SCHATZ, V., TRELAWNY, G. and SCHATZ, A. 1954. Chelation and dental caries. *Euclides, Madr.* **14**, 311-317.
- MARTIN, J. K., KARLSON, E. and SCHATZ, A. 1956. Proteolysis-chelation theory and resorption of bone. *Bact. Proceed. Abstr.* M 125.
- MILLER, B. F., MUNTZ, J. A. and BRADEL, S. 1940. Acid production in saliva and plaque. *J. dent. Res.* **19**, 473-481.
- STRÄLFORS, A. 1950. *Bacterial Chemistry of Dental Plaques*. Dissertation, Stockholm.
- STRÄLFORS, A. and ERICSSON, S. E. 1959. Identification of oral acids. *Odont. Revy* **10**, 138-146.
- TOVERUD, G. and HAGEN, A. R. 1957. Acid formation in plaques. *Norske Tannlaegeforen. Tid.* **67**, 151-159.
- WERNER, J. and ODIN, L. O. 1952. Sialic acid. *Acta Soc. med. Upsal.* **57**, 230-234.

SCHMELZKARIES

EINE KOMBINIERTE LICHTMIKROSKOPISCHE, MIKRO- RADIOGRAPHISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG VORLÄUFIGE MITTEILUNG

G. BERGMAN, M. BRÄNNSTRÖM und P. O. LIND

Abteilung für Zahnhistopathologie der Zahnärztlichen Hochschule
Stockholms

Zusammenfassung—In der transparenten Zone der oberflächlichen Schmelzkariesangriffen konnte mikroradiographisch keine Veränderung des Mineralgehalts im Vergleich mit dem gesunden Schmelz nachgewiesen werden. Es gab in einem Fall eine verstärkte PAS-Reaktion und in einem anderen Fall eine verstärkte metachromatische Reaktion in der transparenten Zone. Dies deutet auf die Möglichkeit, dass Entkalkung nicht die primäre Veränderung im Kariesgeschehen gewesen ist. In einigen tieferen Kariesangriffen war die transparente Zone nicht PAS-positiv aber wies, wie in allen anderen Fällen, negativ Doppelbrechung auf.

Nach Toluidinblaufärbung konnten verschiedene meta- und orthochromatische Reaktionen in der transparenten Zone nachgewiesen werden. Diese komplizierten Veränderungen werden in einem grösseren Material weiter studiert werden.

Abstract—In the early caries lesion we could not demonstrate microradiographically any difference between the translucent zone and adjacent normal enamel in respect of mineral salt content. There was, in one case, an increased PAS reaction and in another case an increased metachromatic reaction in the translucent zone. This might suggest that demineralization was not the primary change in caries. In some deeper caries lesions where the translucent zone exhibited negative birefringence it was not PAS positive.

In the zone of demineralization toluidine blue staining resulted in meta- and orthochromatic reactions and intermediate forms of these reactions at different depths. These complicated changes will be further investigated on larger material.

Résumé—La zone transparente est située plus profondément que la zone sombre et est plus importante dans le cas d'une carie superficielle sans lésion de surface. Il n'y a pas de changement dans le microradiogramme. On observe cependant une coloration P.A.S. plus importante. Il est donc possible que la décalcification ne soit pas l'élément primitif de l'agression carieuse et il se peut qu'il y ait une altération d'un autre type dans l'émail. Dans des caries plus profondes, la zone transparente n'est plus P.A.S. positive mais présente en lumière polarisée des changements.

En superficie par rapport à la zone de décalcification se trouve une zone étroite non décalcifiée. Dans un cas la décalcification de la dentine avait commencé quoique le processus de déminéralisation de l'émail n'avait pas atteint la dentine.

La coloration au bleu de toluidine montre que dans les zones décalcifiées de l'émail ont lieu des altérations complexes de la matrice organique qui ne peuvent être expliquées par les méthodes utilisées.

MATERIAL UND METHODEN

DAS MATERIAL besteht aus Schliffen menschlicher Zähne, die klinisch kreidekariöse Veränderungen aufweisen.

Die Methoden sind lichtmikroskopische, mikroradiographische und histochemische Untersuchungen dieser Schliffe. Lichtmikroskopisch werden die Lage und die Tiefe der dunklen und transparenten Zonen festgestellt, sowie auch ob die Oberfläche gebrochen ist. Mikroradiographisch wird dann die Ausbreitung und Tiefe der Entkalkungszone festgestellt und mit der Tiefe der verschiedenen lichtmikroskopisch gefundenen Zonen verglichen. Die Veränderungen der organischen Bestandteile des Schmelzes werden mit PAS-Färbung und metachromatischer Toluidinblaufärbung studiert.

RESULTATE

*Zahn I**Abbildung 1*

Mikrophoto eines Schliffes von einem Zahn mit einem sehr oberflächlichen Kariesangriff. Unter der dunklen Zone liegt eine tiefere, transparente Zone.

Abbildung 2

Mikroradiogramm desselben Schliffes: die Entkalkung erreicht eine Tiefe, die der dunklen Zone in Abb. 1 entspricht. Die tiefere transparente Zone in Abb. 1 wird von keiner dunklen Entkalkungszone im Mikroradiogramm entsprochen. Die oberflächlichste Schicht des Schmelzes ist wahrscheinlich noch nicht entkalkt. Dieses Verhältnis soll aber mikrophotometrisch kontrolliert werden.

Nach PAS-Färbung desselben Schliffes wurde die entkalkte Zone kräftig PAS-positiv.

Aber auch die tiefere transparente Zone wies eine verstärkte PAS-Reaktion auf. Dies deutet auf die Möglichkeit, dass eine Veränderung der organischen Bestandteile des Schmelzes vorliegt in einem Gebiet, wo die Entkalkung noch nicht angefangen hat.

*Zahn II**Abbildung 3*

Mikrophoto eines Schliffes von einem Zahn mit einem tieferen Kariesangriff als im vorigen Fall und mit einem kleinen Oberflächendefekt. Die transparente Zone ist auch in diesem Fall tiefer gelegen als die Entkalkungszone, was sich bei Vergleichung mit Abb. 4 ergibt.

Abbildung 4

Abb. 4 das ein Mikroradiogramm desselben Schliffes darstellt.

Nach PAS-Färbung desselben Schliffes wurde die dunkle Zone auch in diesem Fall kräftig PAS-positiv, die tiefere transparente Zone aber nicht. Polarisationsoptisch, aber, wies die transparente Zone in diesem Fall, sowie auch im vorigen Fall, veränderte Doppelbrechungsverhältnisse auf.

*Zahn III**Abbildung 5*

Mikrophoto eines Schliffes mit einem Kariesangriff von ungefähr derselben Tiefe wie im vorigen Fall. Keine deutliche transparente Zone.

Abbildung 6

Mikroradiogramm desselben Schliffes. Der tiefste Teil des Schmelzes ist wahrscheinlich nicht entkalkt. Trotzdem hat die Entkalkung schon im Dentin angefangen.

Abbildung 7

PAS-Färbung desselben Schliffes. Kräftig verstärkte PAS-Reaktion im Entkalkungsgebiet des Schmelzes. Schwach verstärkte PAS-Reaktion in einer dünnen Dentinzone unter dem Schmelzkariesangriff, die der Entkalkungszone des Dentins entspricht. Die Färbung mit dem sauren Schiff-Reagenz hat eine selektive Entkalkung des Schmelzes verursacht. Das Kariesgebiet zeigt also eine grössere Säureresistenz als der gesunde Schmelz. In der dünnen unveränderten Schmelzzone unter dem PAS-positiven Gebiet werden zwei schmelzbüschelähnliche Strukturen beobachtet, die stark PAS-positiv sind und die das Entkalkungsgebiet im Schmelz mit der Entkalkungszone des Dentins verbinden. Keine solche Schmelzbüschel werden aber im ungefärbten Schliff gesehen.

*Zahn IV**Abbildung 8*

Mikrophoto eines Schliffes von einem Zahn mit einem doppelten (links) und einem dreifachen Kariesangriff (rechts). Kleiner Oberflächendefekt und eine deutliche tiefe transparente Zone.

Abbildung 9

Mikroradiogramm desselben Schliffes: die verschiedenen Fronten des Kariesangriffs treten hier deutlich hervor als alternierende Verdünnungen und Verdichtungen. Die transparente Zone wird auch hier von keiner mikroradiographischen Veränderung entsprochen.

Abbildung 10

Toluidinblaufärbung desselben Schliffes in schwarz-weiss-Wiedergabe: kräftige metachromatische Färbung nicht nur in den tiefsten Teilen der Entkalkungszone, sondern auch in der ganzen transparenten Zone, die in diesem Bild dunkel hervortritt (vgl. Abb. 8). Wie im Zahn I. kann auch hier eine Veränderung der organischen Bestandteile des Schmelzes stattgefunden haben in einem Gebiet, wo die Entkalkung noch nicht angefangen hat. Die wenig entkalkten Gebiete sind fast ungefärbt. Unter der orthochromatischen Oberflächenzone liegt eine grünliche, negativ metachromatische Zone.

DISKUSSION

Das Auftreten einer transparenten Zone unter der dunklen und entkalkten Zone im Schmelzkariesangriff deutet auf die Möglichkeit, dass die Entkalkung nicht das primäre im Kariesgeschehen ist, sondern dass vorher eine Veränderung anderer Art

im Schmelz geschieht. Es gibt viele Möglichkeiten zur Erklärung des Auftretes von PAS-positivität in der Schmelzkaries, z.B.:

- (1) De-polymerisation der im Schmelz vorkommenden Mukopolysacchariden.
- (2) Erhöhung der Gesamtkonzentration der Mukopolysacchariden im Schmelz. Dies kann durch:
 - (a) Bakterienproduktion im Kariesgebiet, oder
 - (b) reine Diffusion von Speichelmukopolysacchariden verursacht werden.
- (3) Viele Kombinationen von (1) bzw. 2 (a) und 2 (b).

Untersuchungen mit anderen Methoden, die schon angefangen sind, werden hoffentlich die Natur der Veränderungen in der transparenten Zone erklären.

Die Toluidinblaufärbungen zeigen, dass in der Entkalkungszone komplizierte Veränderungen der organischen Bestandteile des Schmelzes stattfinden. Wie diese Veränderungen zu deuten sind, ist schwer zu sagen, ehe genügend feine Schnittmethoden zur Verfügung stehen, mit denen es möglich wird, viele Schliffe durch denselben Kariesangriff zu bekommen, damit man viele vergleichende Untersuchungsmethoden in jedem Fall verwenden kann. Solche Schiffmethoden werden an der Zahnärztlichen Hochschule Stockholms ausprobiert, und hoffentlich werden daraus Ergebnisse erstehen, die dieses Problem erfolgreich erklären können.

SCHMELZKARIES



Abb. 1



Abb. 2

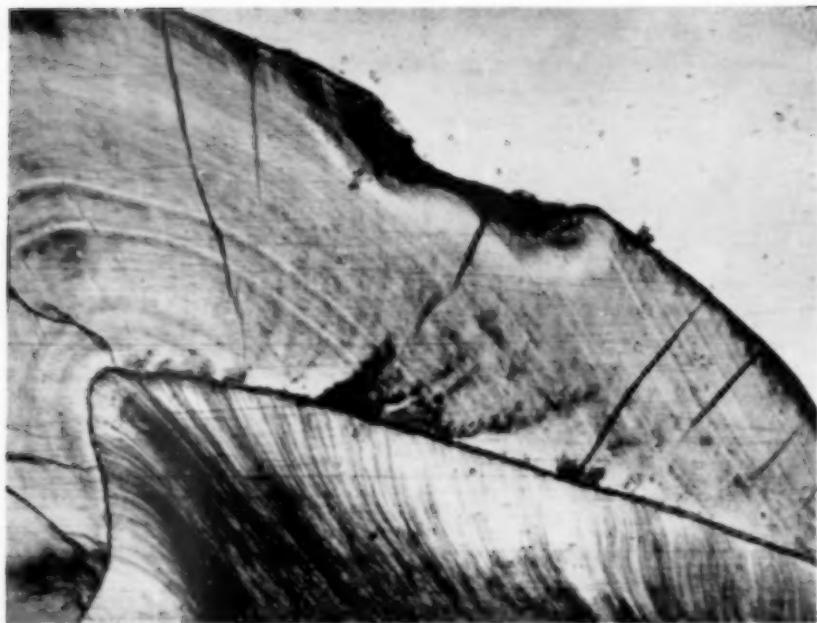


Abb. 3



Abb. 4

SCHMELZKARIES



Abb. 5



Abb. 6

G. BERGMAN, M. BRÄNNSTRÖM UND P. O. LIND

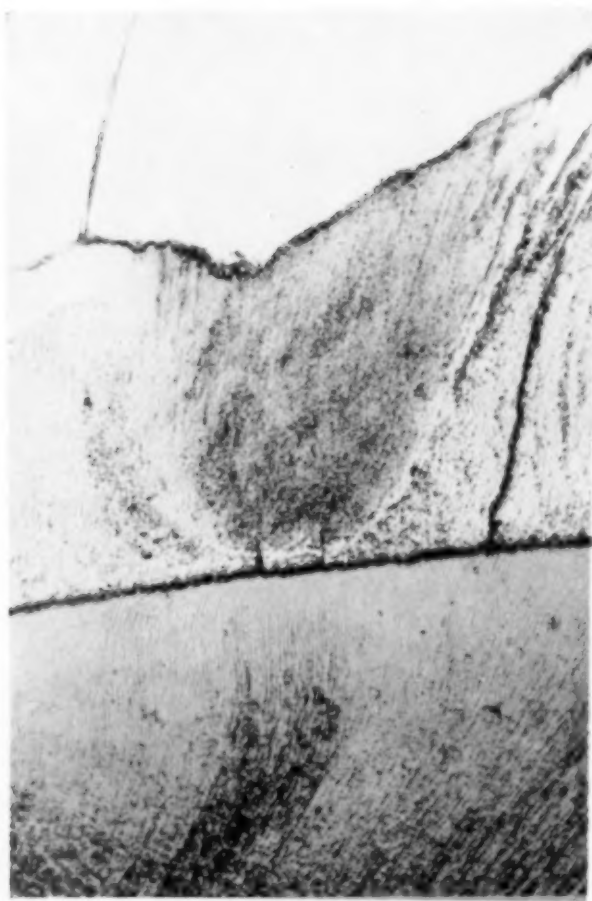


Abb. 7

SCHMELZKARIES



Abb. 8



Abb. 9

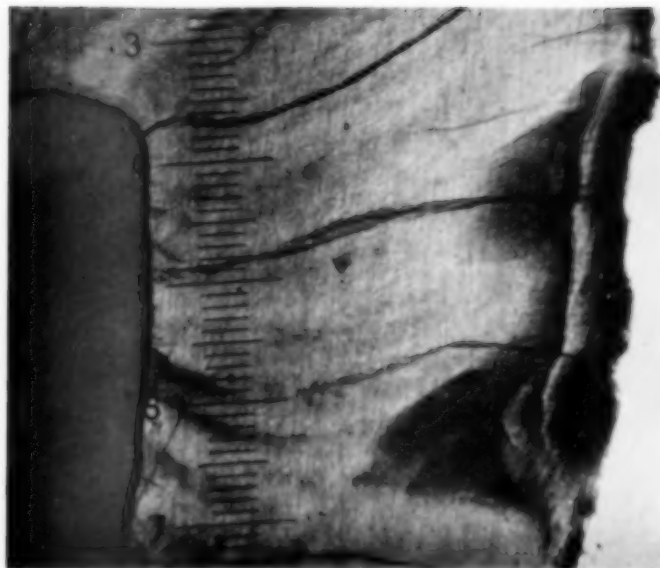


Abb. 10

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN MECHANISCHER UND CHEMISCHER VERLETZUNGEN DES SCHMELZES

A. G. E. SCHMIDT

Technische Universität Berlin, Lehrgebiet Biologie and Anthropologie, und aus dem
Kariesforschungsinstitut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Aussenstelle
Berlin-Dahlem

Zusammenfassung—Mit Hilfe einer neu entwickelten "gezielten" Präparation war es möglich, die durch mechanische und chemische Einwirkungen auftretenden Veränderungen der Schmelzoberfläche elektronenmikroskopisch zu beobachten und damit ergänzend zu den lichtmikroskopischen Untersuchungen Einblicke in die sublichtmikroskopischen Vorgänge zu gewinnen.

Bei mechanischen Einwirkungen kommt es zu einer plastischen Verformung der obersten Schichten der Schmelzoberfläche, bei der alle vorhandenen Strukturen ausgelöscht werden. Die mechanisch veränderten Stellen erwiesen sich gegen Säureangriffe weniger resistent als die unveränderte Umgebung.

Abstract—The development of a method of investigation by which small areas of enamel surface can be located and examined in the electron microscope made possible this investigation of changes in the outer enamel surface brought about by mechanical and chemical injury.

In this series of experiments, the outer enamel surface of extracted teeth was mechanically scratched and the effect of acids on these lesions under varying conditions was studied. Examination of the surface at each phase of this treatment revealed information about the sub-light-microscopic structure of the surface enamel.

The mechanical injury caused a plastic deformation of the outermost layer of the surface enamel so that all the previous structures disappeared and the surface became more homogeneous in appearance. The track of the injury appeared smooth and structureless and could clearly be distinguished from the surrounding normal enamel. The mechanically damaged areas appear, from results to date, to have a reduced resistance to the action of acids.

Résumé—L'investigation des altérations mécaniques et chimiques de la surface de l'émail a été rendue possible par la mise au point d'une méthode de préparation spéciale qui permet toujours d'observer le même endroit de la surface de l'émail sous le microscope électronique.

Des stries furent appliquées mécaniquement à la surface de l'émail de dents extraites. Ces stries furent soumises à l'action d'acides sous diverses conditions expérimentales; l'observation au microscope électronique des différentes phases de ce traitement a permis ainsi de mettre en évidence les altérations sub-microscopiques survenant après une telle attaque.

Les altérations mécaniques provoquent un modelage plastique des couches superficielles de la surface de l'émail, effaçant les structures existantes. La strie mécanique se présente comme une surface plate sans structure qui se distingue nettement des structures normales avoisinantes. Les endroits lésés mécaniquement semblent avoir une résistance diminuée vis-à-vis des agents acides.

DIE UNTERSUCHUNGEN von Zahnoberflächen haben stark an Bedeutung gewonnen, seitdem WOLF (1940) die Abdruckmethode (Replicatetechnik) in die Zahnheilkunde einfuhrte. Die Vorteile dieses Verfahrens beruhen darin, dass das Relief der betreffenden Oberfläche objektgetreu bewahrt wird und dass jene störenden optischen Effekte vermieden werden, die beim Eindringen des Lichtes in die oberflächlichen Schichten des Zahnes durch die mikrokristalline Natur und Struktur des Schmelzes immer im Lichtmikroskop auftreten. Erst die Abdruckmethode ermöglichte genauere Einblicke in das Verhalten der Schmelzoberfläche bei beginnender Schmelzkaries, bei Auflagerung von Bakterienplaques, bei Abrasion sowie bei Anwendung von kariesprophylaktischen Mitteln. Über diese Probleme sind in der letzten Zeit sehr aufschlussreiche lichtmikroskopische Arbeiten von HEUSER (1952a,b, 1958), MANNERBERG (1960), MÜHLEMANN (1960a,b) u.a. erschienen. Aber auch in der Elektronenmikroskopie wurde diese Methode mit guten Erfolgen von ADOLPH (1958a,b,c,d), BERLIN (1959), HELMCKE (1953), MATSUMIYA und TAKUMA (1954), PEDERSEN und SCOTT (1959), SCOTT und WYCKOFF (1947, 1949) und SCOTT, KAPLAN und WYCKOFF (1949) angewandt.

MATERIAL UND METHODE

Meine elektronenmikroskopischen Untersuchungen sollten die Veränderungen des Schmelzes nach mechanischen und chemischen Verletzungen ermitteln. Hierzu war jedoch eine zusätzliche, gezielte Präparationstechnik erforderlich, um immer wieder dieselbe Stelle der Oberfläche auf die lichte Öffnung ($100 \times 1000 \mu$) des Objektträgers (Schlitzblende) zu bekommen. Nur hierdurch lassen sich alle Bilder der verschiedenen Stadien einer Versuchsreihe miteinander vergleichen und einwandfreie Rückschlüsse auf die Art der Veränderungen ziehen. Die Untersuchungen wurden an extrahierten Zähnen ($\overline{7}$, $\overline{5}$, $\overline{4}$, $\underline{1}$, $\underline{1}$) durchgeführt, die trocken aufbewahrt wurden und deren Oberflächen im Lichtmikroskop keine Beschädigungen erkennen liessen. Ähnlich wie bei lichtmikroskopischen Untersuchungen werden zwei Markierungen auf der Schmelzoberfläche angebracht, die jedoch so fein sein müssen, dass sie neben den gesuchten Strukturen noch innerhalb des Schlitzes des elektronenmikroskopischen Objektträgers Platz finden und später als Vermessungspunkte dienen. Wir verwenden hierzu einen Vickers-Mikrohärteprüfer, dessen auf allen Abdrücken abgebildete Diamantpyramide (Abb. 1) uns den Beweis für die Identität der Objektstellen liefert.

UNTERSUCHUNGEN

(A) Mechanische und chemische Verletzungen einer schwach angeschliffenen und polierten Schmelzoberfläche eines rechten unteren Molaren ($\overline{7}$), der nach der Extraktion trocken aufbewahrt wurde.

1. Eine Schmelzoberfläche wird angeschliffen, poliert und drei Sekunden mit 1prozentiger HCl angeätzt, um die Prismenstruktur aufzuschliessen. Anschliessend werden im Abstand von 600μ zwei Pyramideneindrücke angebracht und mehrere Triafolabdrücke genommen, auf denen die beiden Eindruckstellen mit der dazwischenliegenden angeätzten Zone erscheinen (Abb. 2 und 2a).

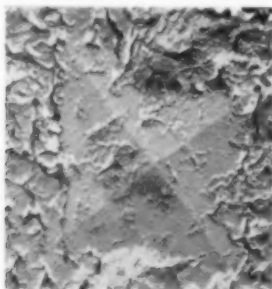


Abb. 1. Eindruckstelle eines Vickers Mikrohärteprüfers auf einer nach dem Polieren angeätzten Schmelzoberfläche. $\times 1200$.

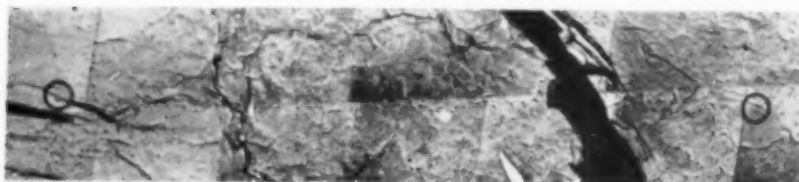


Abb. 2. Pyramideneindrücke auf einer nach dem Polieren angeätzten Schmelzoberfläche. Die Schnittpunkte der Pyramidenkoordinaten liegen in der Mitte der Kreise. $\times 360$.

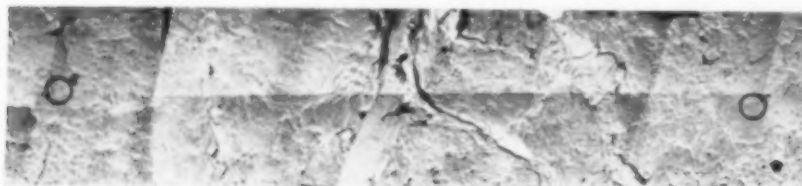


Abb. 3. Pyramideneindrücke auf einer nach dem Polieren angeätzten Schmelzoberfläche (situationsgleich zu Abb. 2) mit dazwischenliegender Ritzverletzung. $\times 360$.

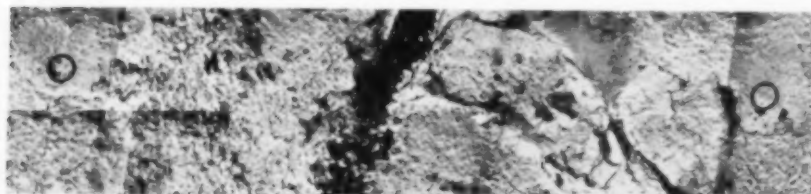


Abb. 4. Pyramideneindrücke auf einer nach dem Polieren angeätzten Schmelzoberfläche (situationsgleich zu Abb. 2 und 3) mit dazwischenliegender, nach dem Ritzen 3 Sekunden mit 1prozentiger HCl angeätzter Zone. $\times 360$.

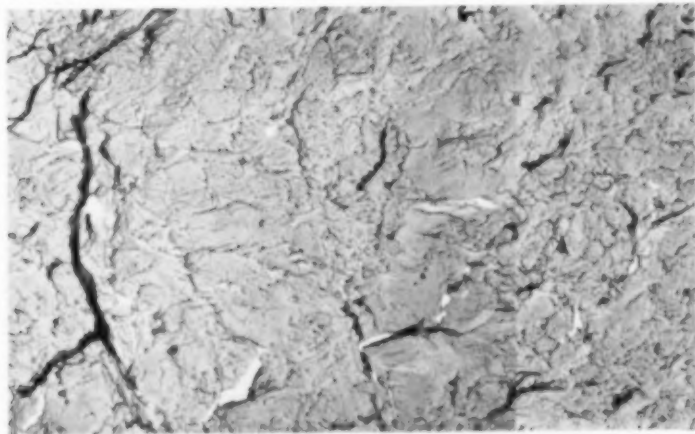


Abb. 2a. Ausschnittsvergrößerung aus
Abb. 2. Angeätzter Schmelz vor der mechanischen Verletzung. $\times 2100$.

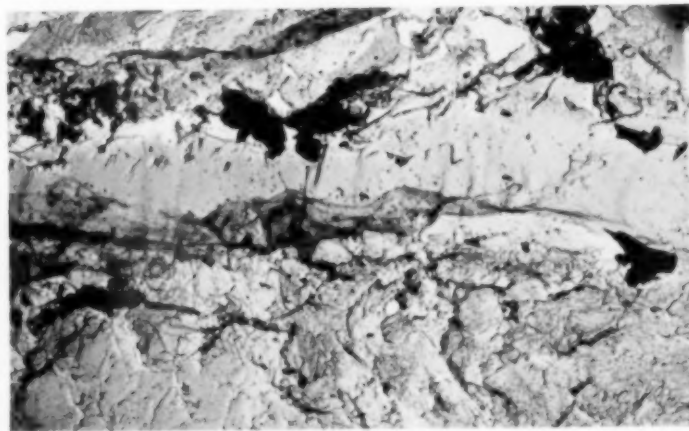


Abb. 3a. Ausschnittsvergrößerung aus
Abb. 3. Angeätzter Schmelz nach dem
Ritzen mit einer Rasierklinge. $\times 2100$.

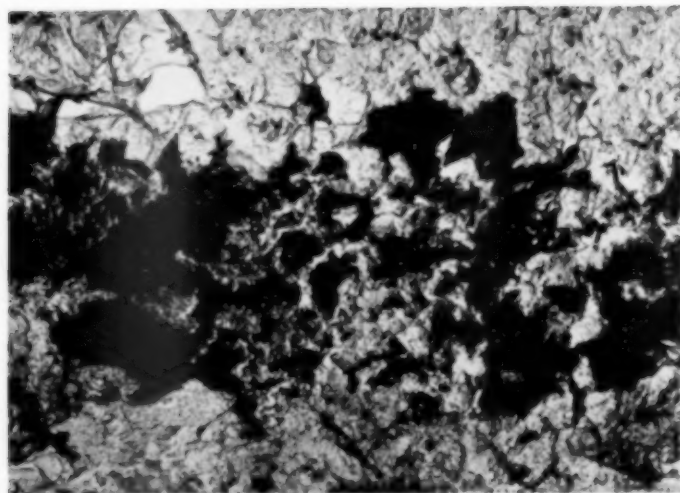


Abb. 4a. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 4.
Ritzverletzung und Umgebung 3 Sekunden mit
1prozentiger HCl angeätzt. $\times 2100$.

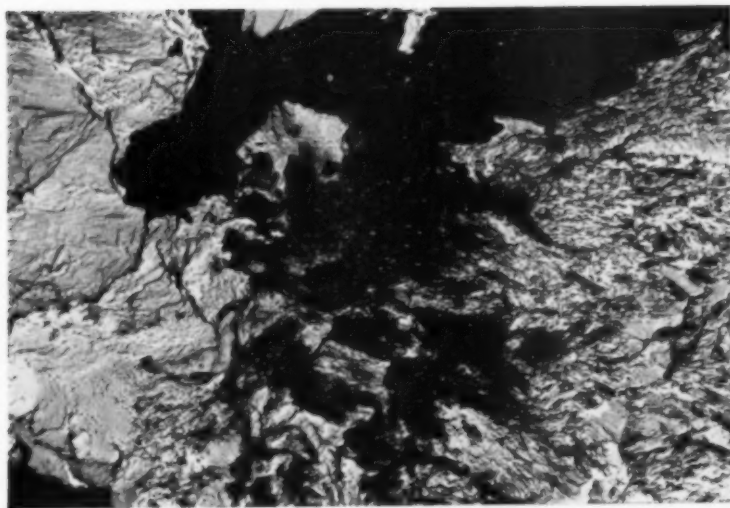


Abb. 5a. Ritzverletzung einer Schmelzbruchfläche nach 3 Sekunden Anätzen mit 1prozentiger HCl (erster Abdruck nach Anätzung). $\times 2600$.

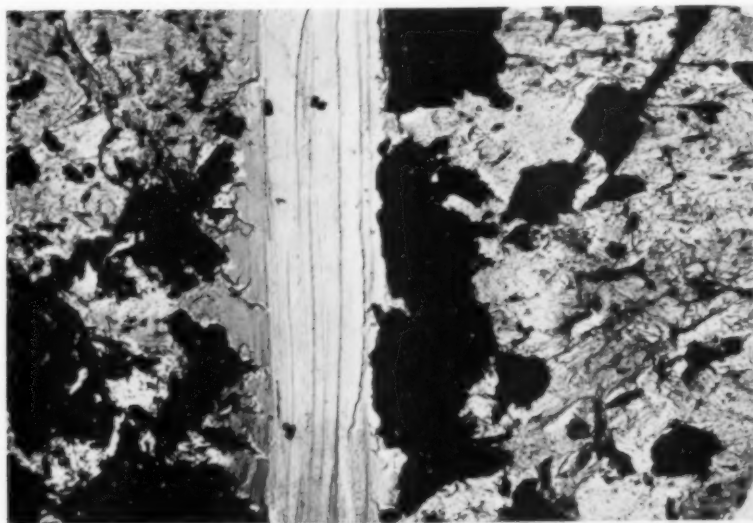
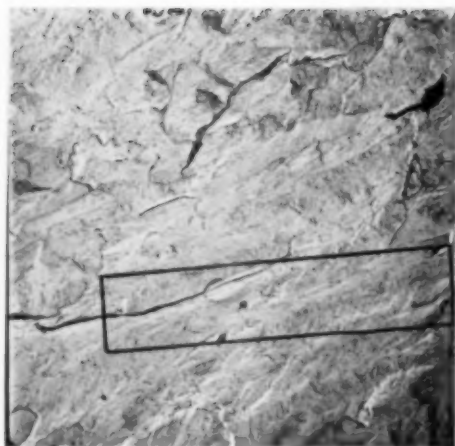
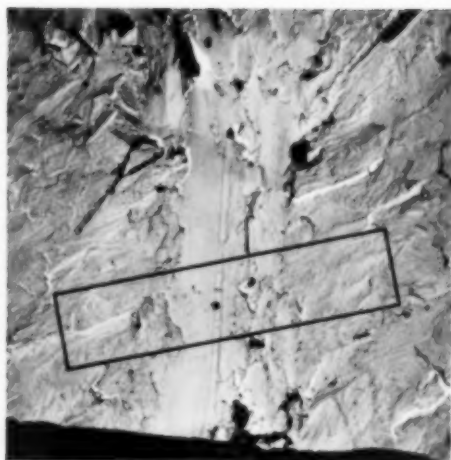


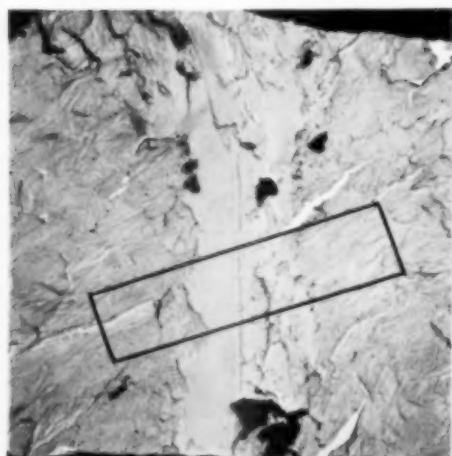
Abb. 5. Ritzverletzung einer Schmelzbruchfläche (erster Abdruck). $\times 2600$.



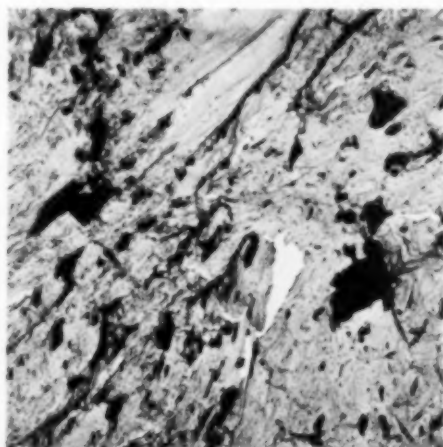
Ann. 6a. Unverletzte Schmelzbruchfläche. $\times 1200$.



Ann. 6b. Durch Ritzen verletzte Schmelzbruchfläche (erster Abdruck). $\times 1200$.



Ann. 6c. Durch Ritzen verletzte Schmelzbruchfläche (zweiter Abdruck). $\times 1200$.



Ann. 6d. 3 Sekunden mit 1prozentiger HCl angeätzte Ritzverletzung. $\times 1200$.



Abb. 7a. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 6a. Schmelzstruktur vor der Verletzung. $\times 4300$.

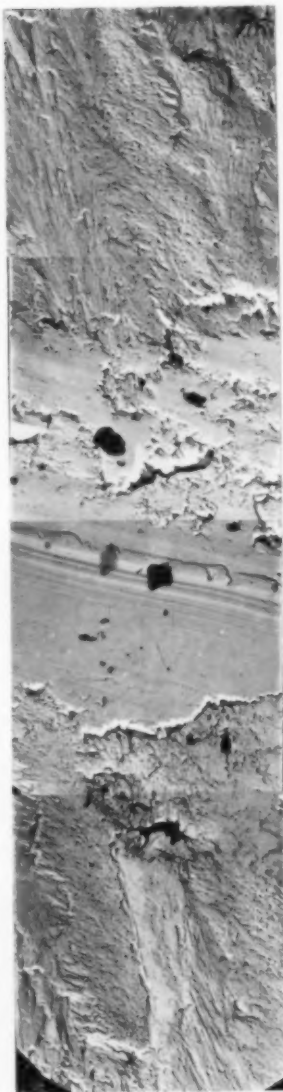


Abb. 7b. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 6b. Schmelzstruktur nach dem Ritzten mit einer Rasierklinge (zweiter Abdruck). $\times 4300$.

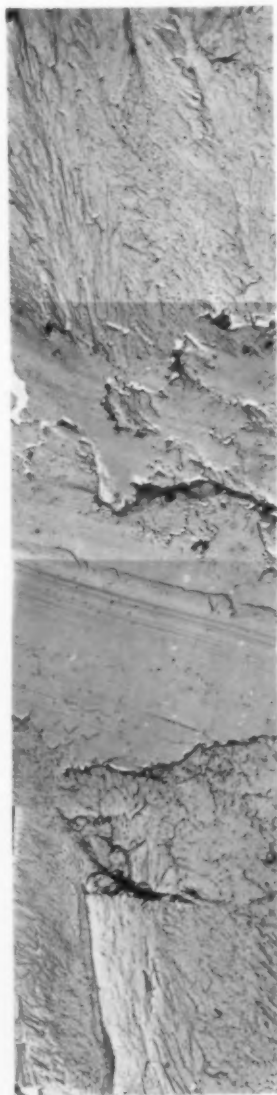


Abb. 7c. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 6c. Schmelzstruktur nach dem Ritzten mit einer Rasierklinge (dritter Abdruck). $\times 4300$.



Abb. 8a. Ritzverletzung einer Schmelzoberfläche nach $1\frac{1}{2}$ Minuten Anätzen mit 1prozentiger Zitronensäure (erster Abdruck nach Anätzung). $\times 1200$.

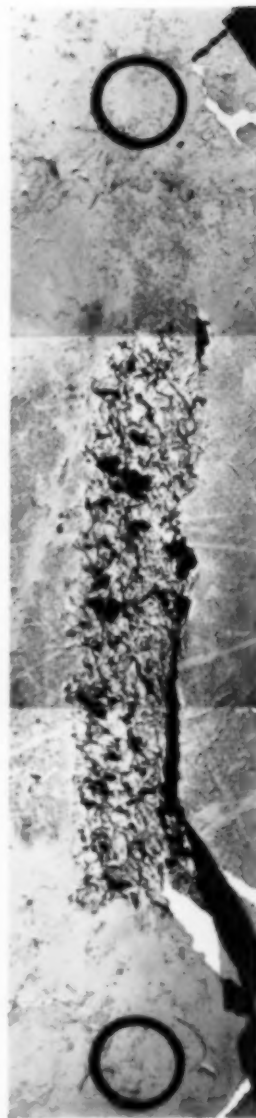


Abb. 8b. Ritzverletzung einer Schmelzoberfläche nach $1\frac{1}{2}$ Minuten Anätzen mit 1prozentiger Zitronensäure (vierter Abdruck nach Anätzung). $\times 1200$.

2. Anschliessend wird die Fläche unter dem Lichtmikroskop mit einer Rasierklinge zwischen den Pyramideneindrücken geritzt. Die Aufnahme zeigt, dass im Bereich der völlig eingeebneten Ritzspur keine Schmelzstruktur mehr zu erkennen ist (Abb. 3 und 3a).

3. Die Pyramideneindrücke werden dann unter dem Lichtmikroskop mit Zaponlack abgedeckt, damit sie bei der folgenden Behandlung des Zahnes nicht von der Säure angegriffen werden, sondern weiter als Vermessungspunkte erhalten bleiben. Zwischen den beiden abgedeckten Stellen liegt eine freie Zone mit der Ritzverletzung. Mit einer Mikropipette wird 1prozentige HCl aufgebracht, die drei Sekunden einwirkt. Die nächste Aufnahme zeigt, dass besonders im Bereich der Ritzverletzung sehr viele Kristallbrocken des Schmelzes am Triafolabdruck haften ("Pseudoreplica") (Abb. 4 und 4a).

4. Diese Stelle wird nun mehrfach abgedrückt, um die Eindringtiefe der Ätzung zu prüfen. Bereits der vierte Abdruck zeigt eine völlig normale Schmelzstruktur, auf der man den Verlauf der ehemaligen Ritzverletzung kaum noch wahrnehmen kann. Dieses mag als ein Beweis für die sehr geringe Dicke jener Schicht dienen, die durch die mechanische Verletzung verformt wurde.

(B) Mechanische und chemische Verletzung einer Schmelzbruchfläche eines rechten unteren Prämolaren (5/), der nach der Extraktion trocken aufbewahrt wurde.

Auf dem ersten Abdruck von der mechanisch geritzten Bruchfläche sind neben der plastisch verformten Ritzspur viele herausgerissene Komplexe von Kristallen sowohl auf der ursprünglichen Bruchfläche als auch besonders in den Randzonen der Verletzung zu erkennen (Abb. 5). Nach drei Sekunden Ätzen mit 1prozentiger HCl (erster Abdruck nach Anätzung) sind vermehrt herausgerissene Kristalle aus dem mechanisch verletzten Gebiet zu sehen (Abb. 5a).

Der gleiche Versuch wurde an einer anderen Bruchfläche wiederholt (4). Die Abbildungen zeigen zunächst die unverletzte (Abb. 6a), dann die mechanisch verletzte (Abb. 6b und 6c) und schliesslich die anschliessend noch chemisch verletzte Bruchfläche (Abb. 6d) in 1200facher Vergrösserung. Die Ausschnittsvergrösserungen aus der Bruchfläche vor (Abb. 7a) und nach der Ritzverletzung (Abb. 7b und 7c) in 7200facher Vergrösserung beweisen, dass die Veränderungen des Schmelzes nach mechanischen Verletzungen wirklich objektgetreu wiedergegeben sind und nicht auf Artefakte zurückgeführt werden können. Im Bereich der Ritzspur hat eine völlige Auslöschung der Prismenstruktur stattgefunden, die selbst auf einem späteren Abdruck noch in gleicher Ausprägung erhalten blieb.

(C) Mechanische und chemische Verletzung einer unvorbehandelten Schmelzoberfläche (1).

Eine natürliche Schmelzoberfläche wird erst mit einer Rasierklinge geritzt und dann $1\frac{1}{2}$ Minuten mit 1prozentiger Milchsäure geätzt. Auch hier erfolgte der Säureangriff im Bereich der mechanischen Verletzung stärker als in der unverletzten Umgebung.

Wird nach gleicher mechanischer Ritzung einer Schmelzoberfläche $1\frac{1}{2}$ Minuten mit 1prozentiger Zitronensäure angeätzt, dann haften an dem ersten Abdruck nach der Ätzung sehr viele Kristalle im Bereich der Verletzung und zwar wesentlich mehr

als bei dem Versuch mit Milchsäure, während die Umgebung hier wie auch in den vorher geschilderten Versuchen relativ schwach angegriffen wurde (Abb. 8a und b).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die vergleichende Betrachtung der Abbildungen gestattet exakte Aussagen über die Art der eingetretenen Veränderungen an einer Schmelzstruktur nach mechanischer Ritzverletzung und anschließender Ätzung mit verschiedenen Säuren (Salz-, Milch- und Zitronensäure). Die mechanische Verletzung entspricht einer Beanspruchung des Schmelzes über die Elastizitätsgrenze hinaus. Die glatt erscheinenden Schichten sind wahrscheinlich auf plastische Verformungen zurückzuführen, die an Rayleigh-Beilby-Schichten erinnern. Diese Schichten haften so fest auf den darunter befindlichen, unverletzten Strukturen, dass nach einer Serie von 36 Abdrücken elektronenmikroskopisch keine Veränderungen feststellbar sind, die auf ihre Ablösung hindeuten könnten. Es kann sich also kaum um eingepressten Schleifstaub handeln, wie z. T. von anderer Seite angenommen wurde.

Ferner kann aus den Untersuchungsreihen geschlossen werden, dass durch mechanische Verletzungen von Schmelzoberflächen eine geringere Resistenz gegenüber Säureeinwirkungen resultiert. Die nach den Anätzungen gewonnenen Bilder zeigten alle in den Bereichen der mechanischen Verletzungen einen verstärkten Säureangriff. Da schon der jeweils vierte Abdruck nach der Anätzung von mechanisch verletzten Schmelzflächen (Bruchflächen, angeschliffenen Oberflächen sowie nach dem Polieren angeätzten Oberflächen) die frühere Verletzung nicht oder nur kaum noch zeigt, kann die Mächtigkeit der durch die mechanische Verletzung geglätteten Schicht nur sehr gering sein.

Bei Verletzungen von natürlichen, glatten Schmelzoberflächen blieb nach dem Anätzen im Gebiet der mechanischen Verletzung eine stark strukturierte Zone zurück, die zunächst eine Wunde in der Schmelzoberfläche darstellt. Inwieweit sich diese Stelle durch Remineralisation bzw. Auflagerung von Deckschichten organisiert oder ob sie durch Abrasion wieder geglättet wird, soll an Versuchen *in vivo* elektronenmikroskopisch noch erforscht werden.

LITERATUR

- ADOLPH, W. 1958a. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an maschinell bearbeiteten Dentin-oberflächen von Zähnen mit lebender Pulpa. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **13**, 635-644.
- ADOLPH, W. 1958b. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Dentinoberflächen, die bei Anwesenheit von Wasser, Pressluft und Speichel maschinell bearbeitet wurden. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **13**, 758-767.
- ADOLPH, W. 1958c. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Einfluss von Medikamenten auf die Struktur beschliffener Dentinoberflächen von Zähnen mit lebender gesunder Pulpa. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **13**, 816-825.
- ADOLPH, W. 1958d. Betrachtungen zum Problem der mechanischen Freilegung des Dentins und deren Folgen im Bereich der verletzten organischen Substanz. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **13**, 1185-1192.
- BERLIN, V. 1959. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mechanischer und chemischer Verletzungen des Schmelzes. Vortrag ORCA, Pavia.
- HELMCKE, J.-G. 1953 und 1957. *Atlas des menschlichen Zahnes im elektronenmikroskopischen Bild*. Transmare-Photo G.m.b.H., Berlin-Wilmersdorf.

- HEUSER, H. 1952a. Das Initialstadium der Karies vom oberflächenhistologischen Standpunkt aus gesehen. *Dtsch. zahnärztl. Z.* 7, 1187-1197.
- HEUSER, H. 1952b. Oberflächenhistologische Untersuchungen zur pathologischen Physiologie der chronischen Karies. *Zahnärztl. Welt* 22, 498-504.
- HEUSER, H. 1958. Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Zahnschutzhärtung im Blickfeld der Reliefmikroskopie. *Stoma* (1958), 88-94.
- MANNERBERG, F. 1960. Appearance of tooth surface. *Odont. Revy* 11, Suppl. 6.
- MATSUMIYA, S. und TAKUMA, S. 1954. *Atlas of Electron Micrographs of the Human Dental Tissues* Tokyo Dental College Press.
- MÜHLEMANN, H. R. 1960a. Experimental modifications of the animal surface. *Helv. odont. Acta* 4, 5-24.
- MÜHLEMANN, H. R. 1960b. Protection of the white spot enamel by different fluorides. *Helv. odont. Acta* 4, 24-27.
- PEDERSEN, P. O. und SCOTT, D. B. 1959. Replica studies of the surfaces of teeth showing evidence of chronic endemic fluorosis. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* 31, 177-190.
- SCOTT, D. B., KAPLAN, H. und WYCKOFF, R. W. G. 1949. Replica studies of changes in tooth surfaces with age. *J. dent. Res. St. Louis* 28, 31-47.
- SCOTT, D. B. und WYCKOFF, R. W. G. 1947. Shadowed replicas of ground sections through teeth. *Publ. Hlth Rep., Wash.* 62, 422-425.
- SCOTT, D. B. und WYCKOFF, R. W. G. 1949. Studies of tooth surface structure by optical and electron microscopy. *J. Amer. dent. Ass.* 39, 275-282.

MECHANISMS OF FLUORIDE HOMEOSTASIS

W. D. ARMSTRONG

University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, U.S.A.

Abstract—The mechanisms of fluoride excretion have been studied in two human subjects, in dogs and in normal and nephrectomized rats with radio fluoride. The author gives a summary of these different studies. It appears that the body possesses a remarkable ability to maintain a constancy of body fluid fluoride concentration in spite of large variations of fluoride intake. These mechanisms of homeostasis are carried out by the kidney, which operates as an effective organ of fluoride excretion, as well as by the skeleton.

Résumé—Les mécanismes d'excrétion du fluor ont été étudiés à l'aide du fluor radioactif chez l'homme et chez diverses espèces animales (chien, rats normaux et néphrectomisés). L'auteur résume ces différentes recherches. Il ressort ainsi que la concentration en ions fluor de l'organisme est maintenue remarquablement constante malgré de grandes variations dans l'ingestion du fluor. Cette homéostasie est assurée par le rein, agent d'excrétion du fluor et par le squelette.

Zusammenfassung—Mit Hilfe von radioaktivem Fluor wurde der Mechanismus der Fluorauausscheidung beim Menschen und an verschiedenen Tieren (Hunde, normale und nephrektomierte Ratten) untersucht. Trotz grossen Schwankungen in der Fluoreinnahme bleibt die Fluorionenkonzentration im Organismus bemerkenswert konstant. Diese Homeostase wird durch die Nieren als Fluorauausscheidungsorgan und durch das Skelett gesichert.

INTEREST in the metabolism of the fluoride ion stems mainly from considerations of the health safety of water fluoridation. The evidence for the dental health benefits of optimal concentrations of fluoride in communal waters is now so extensive and convincing that it is no longer possible to bring the advantages of properly controlled programmes of water fluoridation into question. Likewise experiments of nature have demonstrated the health safety of those amounts of fluoride in water required to give the full caries inhibitory effect. These experiments have allowed the epidemiological, physical and laboratory examinations of persons who have used, over long periods of time, waters containing considerably more fluoride than that required to obtain the desired result in reducing the dental caries attack rate (LEONE *et al.*, 1954, 1955; McCLURE and ZIPKIN, 1958). These studies have failed to reveal any increase in disease attack rates or abnormal clinical findings consequent upon the use of water with a fluoride content much greater than required to obtain the useful results. The most sensitive indicator of excessive intakes of fluoride in a population is the appearance of mottled enamel in the permanent teeth of those persons who use the water during the period of tooth formation. Since the use of water as a beverage is affected to some degree by national dietary habits and by climate there is a problem in making a decision as to the optimal fluoride concentration in water in countries in which the dietary customs and climate are considerably different from those which

obtain in the United States and southern Canada. In each cultural and geographic circumstance in which this problem is considered the best solution could be derived from an examination of the correlation of mottled enamel, dental caries attack rate and natural water fluoride content in each county or over regions of similar ethnic groups. Such a study is that of ERICSSON and SUNDIN (1960). Alternately, for reasons which will be developed later, an amount of fluoride could be added to the communal water which would produce a urine fluoride concentration equal to those of persons in the temperate part of the United States who use water with a fluoride content of 1 p.p.m. Dental fluorosis and the occurrence of cases of osteosclerosis, caused by very high intakes of fluoride, are the only abnormal conditions related to fluoride intake for which authentic and confirmed evidence has been produced. Fortunately the dental benefits of fluoride intake from water can be obtained without producing unesthetic degrees of mottled enamel or skeletal abnormalities since water fluoridation can be controlled at levels which produce the full benefits without causing the undesirable results.

Even though the results of the studies with the humans ingesting far more fluoride than is necessary have demonstrated the health safety of water fluoridation, it is still desirable to add to these conclusions the results of studies of the metabolism of the fluoride ion. The results of such studies should make it possible to decide on logical grounds whether unrecognized and unconsidered effects of fluoride can occur through the use of fluoridated water. This report will summarize the work along these lines carried out at the University of Minnesota in collaboration with Dr. LEON SINGER, Dr. CURTIS CARLSON and Dr. POTHAPRAGADA VENKATESWARLU. In this work we have seen that the body possesses a remarkable ability to maintain a constancy of body fluid concentration in spite of large variations of fluoride intake. These mechanisms of homeostasis are carried out by the kidney which operates as an effective organ of fluoride excretion and by the skeleton.

TABLE I. FLUORIDE IN HUMAN BLOOD PLASMA OBTAINED FROM NORMAL DONORS

Community	No. of samples	Date of plasma collection	Fluoride (p.p.m.)	
			Plasma \pm S.E.	Water supply
Rochester, Minn.	16	23.v.58	0.14 \pm 0.0050	0.15
Minneapolis St. Paul, Minn.	18	12.vi.58	0.15 \pm 0.0044	1.1
Grand Rapids, Mich.	36	9.ii.59	0.19 \pm 0.0085	1.1
Gettysburg, S.D.	26	1.xii.58	0.16 \pm 0.0073	2.5
Lake Preston, S.D.	22	25.vi.58	0.26 \pm 0.0124	5.4

Table I, derived from the work of SINGER and ARMSTRONG (1960), shows that the mean plasma fluoride content is not different in persons who use a communal water containing 0.15 or 2.5 p.p.m. fluoride. When the water contains as much as

5.4 p.p.m. fluoride there is a significant rise in mean plasma fluoride content but these concentrations are still below those which affect the *in vitro* activity of some enzymes known to be sensitive to fluoride ion (SMITH, ARMSTRONG and SINGER, 1959).

The urine is an important avenue of fluoride excretion and it is already known that the fluoride content of the urine increases in relation to the fluoride intake (ZIPKIN *et al.*, 1956). The mechanisms of renal excretion of fluoride have been investigated through the use of radiofluoride (F^{18} ; half-life 110 min). Renal clearances of continuously infused radiofluoride were measured (CARLSON *et al.*, 1960) in ten dogs in which a large part of the skeleton had been excluded from the system in order to produce a more constant plasma radiofluoride concentration. The results were evaluated to describe the factors of glomerular filtration and tubular reabsorption of fluoride under several conditions. The animals that received carrier-free radiofluoride infusions excreted urine with a mean radiofluoride concentration 3.4–14.5 times that of the plasma. The urine:plasma concentration ratios obtained with animals given a load of stable fluoride was 13.5–29.6. An increased urine volume resulted in a decreased tubular reabsorption of fluoride and the clearance was increased, thus indicating that diuresis promotes fluoride excretion and suggests that cases of renal disease in which tubular resorption of water is reduced would exhibit an enhanced urinary output of fluoride. Chlorothiazide increased radiofluoride excretion but decreased the urine concentration. The radiofluoride clearances were always less than the creatinine clearances but were 7.8–179 times the chloride clearances. (Creatinine clearance defines the volume of glomerular filtrate and the difference between creatinine clearance and fluoride clearance represents the fraction of filtered fluoride reabsorbed by the tubules.) The effect of chlorothiazide was to decrease the ratio of fluoride to chloride clearance by increasing chloride clearance more than fluoride clearance.

In a study using two human subjects also employing radiofluoride observations of renal clearance of fluoride, chloride and creatinine were made (CARLSON, ARMSTRONG and SINGER, 1960a). The fluoride clearance always exceeded chloride clearance by many-fold and was increased by increases of urine output, but fluoride clearance was always less than creatinine clearance. The renal tubules in two individuals, reabsorbed respectively 51 and 63 per cent of fluoride in the glomerular filtrate which indicates a net process of glomerular filtration with a variable amount of tubular reabsorption. The plasma contained 72 per cent of whole blood radiofluoride and radiofluoride concentration of plasma exceeded that of parotid gland saliva. Measurement of uptake and release of the radioisotope by soft tissues and by the skeleton showed characteristic differences of radiofluoride turnover in these tissues. The skeletal tissues retained the isotope but the soft tissues lost nearly all their activity within 4 hr after ingestion. It was calculated that no more than 10 per cent of an oral dose of fluoride is present in the entire plasma volume at one time.

A study in which labelled fluoride was injected into normal and nephrectomized rats has revealed no differences in the patterns of fluoride distribution in the tissues of the animals (CARLSON, SINGER and ARMSTRONG, 1960). While the soft tissue fluoride content of the animals deprived of kidney function was *ca.* 30 per cent

higher than that of the normal animals the bones of the nephrectomized rats contained a much elevated radiofluoride content. This observation points out that human cases of interference of renal excretion of fluoride, if such exist, still possess an effective mechanism for producing fluoride homeostasis, i.e. skeletal sequestration. In the same study, by a comparison of fluoride and chloride distribution, evidence was obtained that fluoride is distributed through a larger volume of body water than is chloride.

In an investigation of the distribution of radiofluoride between the plasma and erythrocytes of dogs' whole blood it was found that three-quarters of the radiofluoride is in the plasma (CARLSON, ARMSTRONG and SINGER, 1960b). This distribution was influenced by carbon dioxide tension and the radiofluoride migrated from plasma to erythrocytes as did chloride when the carbon dioxide tension was increased. Less than 5 per cent of the plasma radiofluoride was bound to plasma solutes under physiological conditions.

In other studies the uptake of radiofluoride by the skeletons of rats was found not to be affected by extreme variations in the amount of pre-existing fluoride in the bones, the latter variations being produced by feeding of diets of very low or high fluoride content (POTHAPRAGADA, ARMSTRONG and SINGER, unpublished). When radiofluoride and radiochloride were injected simultaneously into rats, the former was found to be distributed through a larger volume of body water than the latter in many tissues, but these distributions were not affected by large variations in the fluoride content of the food on which the animals had been raised.

REFERENCES

- CARLSON, C. H., ARMSTRONG, W. D. and SINGER, L. 1960a. Distribution and excretion of radiofluoride in the human. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **104**, 235-239.
- CARLSON, C. H., ARMSTRONG, W. D. and SINGER, L. 1960b. Distribution, migration and binding of whole blood fluoride evaluated with radiofluoride. *Amer. J. Physiol.* **199**, 187-189.
- CARLSON, C. H., ARMSTRONG, W. D., SINGER, L. and HINSHAW, L. B. 1960. Renal excretion of radiofluoride in the dog. *Amer. J. Physiol.* **198**, 829-832.
- CARLSON, C. H., SINGER, L. and ARMSTRONG, W. D. 1960. Radiofluoride distribution in tissues of normal and nephrectomized rats. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **103**, 418-420.
- ERICSSON, Y. and SUNDIN, B. 1960. Emaljfluoros och karies i ett Svenskt fluorområde. *Svensk tandläk. Tidskr.* **53**, 127-136.
- LEONE, N. C., SHIMKIN, M. B., ARNOLD, F. A., STEVENSON, C. A., ZIMMERMAN, E. R., GEISER, P. B. and LIEBERMAN, J. E. 1954. Medical aspects of excessive fluoride in a water supply. *Publ. Hlth Rep., Wash.* **69**, 925-936.
- LEONE, N. C., STEVENSON, C. A., HILBISH, T. F., SOSMAN, M. C. 1955. A roentgenologic study of a human population exposed to high-fluoride domestic water. A ten year study. *Amer. J. Roentgenol.* **74**, 874-885.
- MCCLURE, F. J. and ZIPKIN, I. 1958. Physiologic effects of fluoride as related to water fluoridation. *Dental Clinics of North America*, pp. 441-458. Saunders, Philadelphia.
- SINGER, L. and ARMSTRONG, W. D. 1960. Regulation of human plasma fluoride concentration. *J. appl. Physiol.* **15**, 508-510.
- SMITH, Q. T., ARMSTRONG, W. D. and SINGER, L. 1959. Inhibition of human salivary and prostatic acid phosphatase and yeast enolase by low fluoride concentrations. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **102**, 170-173.
- ZIPKIN, I., LIKINS, R. C., MCCLURE, F. J. and STEERE, A. C. 1956. Urinary fluoride levels associated with use of a fluoridated water. *Publ. Hlth Rep., Wash.* **71**, 767-772.

ABSORPTION AND METABOLISM OF THE PO_3F ION IN THE ANIMAL BODY

STUDIES WITH F^{18} , P^{32} -LABELLED SODIUM MONOFLUOROPHOSPHATE

Y. ERICSSON, G. SANTESSON and S. ULLBERG

Clinical Laboratory of the Royal Dental School and Department
of Pharmacology of the Royal Veterinary College, Stockholm, Sweden

Abstract—A review of previous literature summarizes data on the biological effects of sodium monofluorophosphate.

The metabolic fate of the monofluorophosphate ion in the animal body has been studied in rats with the use of sodium monofluorophosphate labelled with F^{18} and/or P^{32} .

It is demonstrated that the PO_3F ion is split to a great extent in the body.

Under the experimental conditions phosphorus is absorbed more rapidly from orthophosphate than from monofluorophosphate.

When given in greater concentration and together with calcium ions sodium monofluorophosphate gives rise to a much more rapid fluorine absorption than sodium fluoride given in the same way. This difference disappears if the calcium ions are eliminated by citrate.

Sodium monofluorophosphate thus gives a more stable fluoride supply than sodium fluoride, which is influenced by several calcium-rich foods.

Résumé—Un résumé de littérature comprend les données antérieures sur les effets biologiques du monofluorophosphate de sodium.

Les auteurs ont étudié, chez le rat, le sort métabolique de l'ion monofluorophosphate dans le corps animal en utilisant le monofluorophosphate de sodium marqué des radioisotopes F^{18} et/ou P^{32} .

Il a été démontré que l'ion PO_3F se décompose dans le corps animal.

Dans les circonstances des expériences le phosphore est absorbé plus rapidement d'orthophosphate que de monofluorophosphate.

En administrant le monofluorophosphate de sodium à une grande concentration et en présence d'ions de calcium celui-ci cause une absorption du fluor beaucoup plus rapide que le fluorure de sodium administré de la même façon. En éliminant les ions Ca par le citrate cette différence disparaît.

Le monofluorophosphate de sodium forme donc une source de fluor plus stable que le fluorure de sodium qui est influencé par divers aliments riches en calcium.

Zusammenfassung—Eine Literaturübersicht fasst Daten über die biologischen Wirkungen des Natriummonofluorophosphates zusammen.

Das metabolische Schicksal des Monofluorophosphations im tierischen Körper wurde an Ratten mit Hilfe von Natriummonofluorophosphat studiert, das mit F^{18} und/oder P^{32} markiert war.

Es wurde gezeigt, dass das PO_3F -Ion im Körper aufgespalten wird.

Unter den angewandten Versuchsbedingungen wird Phosphor schneller aus Orthophosphat als aus Monofluorophosphat resorbiert.

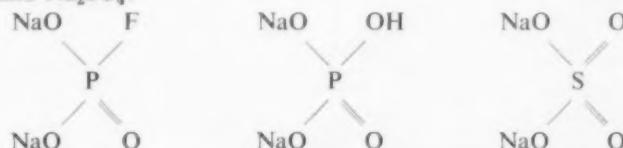
Wenn man Natriummonofluorophosphat in grösseren Konzentrationen und zusammen mit Calciumionen gibt, erhält man eine viel schnellere Fluorabsorption als von Natriumfluorid, auf dieselbe Weise dargereicht. Dieser Unterschied verschwindet, wenn die Calciumionen durch Zitrat eliminiert sind.

Das Natriummonofluorophosphat gibt somit eine konstantere Zufuhr von Fluor als das Natriumfluorid, das von mehreren kalziumreichen Nahrungsmitteln beeinflusst wird.

THE PHYSIOLOGICAL PROPERTIES and effects of the simple alkali fluorides have been extensively studied in a very large number of earlier investigations—especially effects related to enamel formation and caries inhibition. During the last decade several complex fluorine compounds have also been tested in biological research. This research has been of interest mainly because one or several of these complex fluorides might offer some advantages in the prevention of dental caries. Thus ZIPKIN and MCCLURE (1951) and HEIN *et al.* (1951) investigated Na_2SiF_6 , Na_3AlF_6 , BaSiF_6 , K_2SiF_6 , KPF_6 , CF_3COONa and $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$. Of these, KPF_6 and CF_3COONa , although very soluble, do not deposit fluoride in hard tissues or produce dental fluorosis, and do not inhibit caries. KBF_4 has also been reported to be metabolically inactive (LARGENT and HEYROTH, 1949). On the other hand Na_2SiF_6 and the other silicofluorides and $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ are effective caries-reducing agents and deposit fluorine in bone and dental tissues. Na_2SiF_6 is much less soluble than NaF and $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ but also much cheaper. For this reason and since it hydrolyses to free fluoride ions it has become extensively used in fluoridation plants.

This study was planned with the aim to throw light on the metabolism of sodium monofluorophosphate ($\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$) in the animal body.

The configuration of the $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ molecule is undoubtedly isomorphous to those of Na_2HPO_4 and Na_2SO_4 :



A chemical similarity exists especially between $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ and Na_2SO_4 (LANGE, 1929). Sodium monofluorophosphate is easily soluble (about 25 g per 100 g H_2O at 20°C), and the complex ion PO_3F is very stable in aqueous solution above pH 2.5.

In contrast to calcium fluoride, calcium monofluorophosphate has a considerable solubility in water. The difference in solubility between CaPO_3F and CaF_2 is demonstrated in Fig. 1.

Concerning the toxicity of sodium monofluorophosphate, SHOURIE, HEIN and HODGE (1950) reported that the acute toxicity is about three times less than that of NaF (calculated on the basis of fluorine content). They believed that this difference might be attributed to a very low degree of hydrolysis of $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ in the animal body, a hypothesis which ZIPKIN and MCCLURE (1951) felt that they could not support.

HEIN, MARCUSSON and QUIGLEY (1957) reported that fluorine as $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ seems to produce the same degree of mottling of the incisors of albino rats as does fluorine in the form of NaF , and that, consequently, the difference in acute toxicity between

the two compounds is not reflected on the mechanism of fluorosis. JIRASKOVA and RUZICKA (1960), who administered varying doses of $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_3\text{F}$ or NaF to albino rats, found the same uptake of fluorine in the incisors and tibias after either administration but slightly greater histologic changes in the incisor dentine with monofluorophosphate at higher dosage.

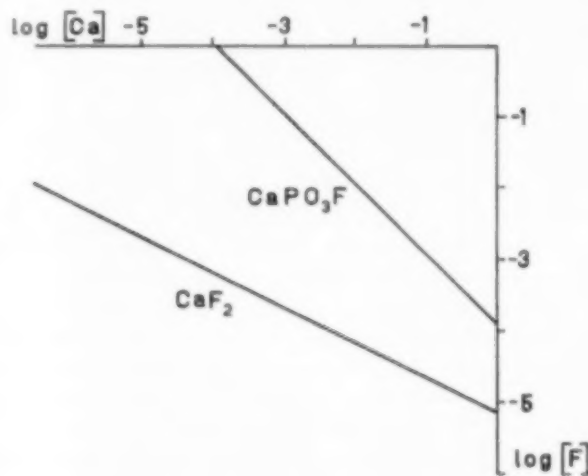


FIG. 1. Solubility diagram for calcium fluoride and calcium monofluorophosphate (37°C). Ionic concentrations corresponding to the areas above the solid lines cause precipitation.

Accumulation of fluorine in bone and dental tissues is quantitatively of about the same order when animals are fed NaF and $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ (50 p.p.m. F in water; ZIPKIN and MCCLURE, 1951). The values for the $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ -group are consistently somewhat higher in the Zipkin-McClure investigation; the difference is not statistically significant, however. According to BURNETT (1955), $\text{K}_2\text{PO}_3\text{F}$ depresses the solubility of dentine in acids to the same extent as NaF . In saline solution, fluorine from $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ is absorbed by powdered human enamel (SANTESSON, 1957). Absorption of fluorine from $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ by human enamel (powder as well as intact surfaces) has also been demonstrated by ERICSSON (1961b), using the F^{18} -labelled compound. In saliva-glucose mixtures $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ gives a higher degree of inhibition of acid production than does NaF ; this effect is not reduced by the addition of calcium ions when $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ is used as is the case when NaF is used (HAYDON, HEIN and GARDNER, 1951).

$\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ inhibits dental caries. SHOURIE *et al.* (1950) found that $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ (at the level of 40 p.p.m. F in distilled water) gives nearly maximal reduction of hamster caries. ZIPKIN and MCCLURE (1951) confirmed this finding using white rats. COSTICH *et al.* (1957) found a lower index for periodontal disease in rats given 40 p.p.m. F as $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ in the drinking water than in control rats. In children, topically applied

$\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ gave 20–30 per cent reduction of caries in 1 year (HAWES, SONNES and BRUDEVOLD, 1954). Sodium monofluorophosphate has also been suggested by SANTESSON (1957) as a suitable compound for salt fluoridation.

The potential clinical usefulness of sodium monofluorophosphate appears from the review given above as does also the desirability of obtaining further knowledge of the metabolism of this substance in the animal body.

This task is, however, a very difficult one since no good and reliable method for determination of the complex ion PO_3F in body tissues and fluids is known. However, a striking possibility to approach this problem entered our minds: if P^{32} -labelled NaPO_3 and F^{18} -labelled NaF could be fused together to form the double labelled $\text{Na}_2\text{P}^{32}\text{O}_3\text{F}^{18}$, it might be possible to follow the fate of the PO_3F -ion in the body. The first trials to produce this compound turned out successfully, and repeated tests showed that the product was of high purity. This substance was used in the investigations to be described.

RADIOMETRIC METHODS

Sodium monofluorophosphate was double labelled with P^{32} and F^{18} according to a method described in a separate article (ERICSSON, 1961a). The principles of this method are the following:

1. Mixing in water solution of NaH_2PO_4 and P^{32} as orthophosphate ions. Evaporation. Heating at 530° for 5 hr gives NaPO_3 labelled with P^{32} .
2. Mixing in water solution of NaF and F^{18} as NH_4F . Evaporation gives NaF labelled with F^{18} .
3. Fusion of $\text{NaP}^{32}\text{O}_3$ and NaF^{18} in stoichiometric proportion at $700\text{--}800^\circ$ gives P^{32} , F^{18} -labelled $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$.

Several tests indicated that this preparation, as carried out in our experiments, gave a product with less than 1.5 per cent of the fluorine as fluoride ions and no detectable free phosphate.

The F^{18} activities were limited by the neutron flux of the uranium reactor and the quantity of target salt that could be inserted into the centre of the reactor. These activities were sufficient, however, for counting specimens of rats in the experiments using up to 6 hr survival time, which will be described below.

The P^{32} labelling had no such limitation but was kept low enough not to exceed the lowest F^{18} counts of the weakest samples by more than a factor of 3 or 4, and thus also not to expose the working personnel to unnecessary radiation.

Single labelling of $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ with F^{18} or P^{32} was performed for some of the experiments. The procedure followed that of the double labelling with the exclusion of one of the isotopes.

For experiments comparing the monofluorophosphate and orthophosphate metabolism P^{32} -labelling of NaH_2PO_4 was performed simply by adding essentially carrier-free P^{32} as the orthophosphate to a solution of NaH_2PO_4 .

Radiometric determination of F^{18} and P^{32} was performed in a well-type scintillation detector with a 1 mm copper filter which absorbed the P^{32} negatrons, so that only

the more homogeneous "bremsstrahlung" reached the scintillator crystal. This considerably reduced the need for attention to geometry detail. The F^{18} counts were slightly increased by the copper filter.

The copper filter had a cylindrical form exactly fitting into the well, and the samples of fluids and tissues were counted in plastic tubes which fitted into the copper cylinder. After weighing, all samples were diluted to the same level marked on the tube, corresponding to 2 ml water. The dilution was made with water in the case of liquids or homogenized intestines, and with half concentrated nitric acid in the case of femurs. This acid dissolved the inorganic salts of the bones in less than an hour, after which the sample was counted.

This geometry was first tested with standard quantities of F^{18} or P^{32} which were diluted with water, nitric acid or nitric acid containing 20 per cent calcium phosphate. There were no differences due to the diluting fluids between the F^{18} or P^{32} counts.

Another series of tests was made with suspensions of minced meat (corresponding to the homogenized intestines to be analysed in the rat experiments) and with femurs of rats. The active solutions were pipetted with micro-pipettes into the marrow space of the femurs and allowed to exchange with the mineral salts for 2 hr before further treatment. Two femurs were left dry in their tubes, two were dissolved in nitric acid and two suspended in distilled water. Tubes with the same active solutions diluted to 2 ml with water served as controls.

These tests revealed no influence of the protein suspensions. Dry femurs gave a nearly 40 per cent increase of the P^{32} counts and about 15 per cent decrease of the F^{18} counts. For femurs plus water the corresponding figures were 8 per cent increase and no change, respectively. For femurs plus HNO_3 , the differences from the controls disappeared.

The above-mentioned geometry was thus found suitable.

The first counting of double labelled samples was done as soon as possible after the preparation of the sample and thus comprised the F^{18} annihilation radiation and the P^{32} bremsstrahlung. After 24 hr, when only about 0.01 per cent of F^{18} remained, a P^{32} count was taken. The F^{18} count was obtained as the difference after recalculation for decay. All counts were then recalculated as percentage of the given dose per gram fluid or tissue, or per total weight of the digestive canal with its contents.

The counting errors were between 1 and 2 per cent for the weakest blood and femur samples, and far less for samples of ingested fluids, digestive tracts and urine.

METHODS USED IN ANIMAL EXPERIMENTATION

Male albino rats weighing between 214 and 395 g were used for the experiments. In experimental groups to be compared the rats were of the same breeding stock and had as closely as possible the same weight. The animals received no food or drinking water from the evening before nor during the experiments, which were started about noon.

Milk was used for the ingestion for several reasons. Relatively high concentrations of the monofluorophosphate had to be used owing to the difficulties of labelling a very small quantity of the salt with an F^{18} activity sufficiently high for experiments

lasting up to 6 hr. The toxicity-reducing action of milk thus appeared valuable. Through its buffering action milk could further be assumed to prevent acid hydrolysis of the monofluorophosphate ion in the stomach. Finally, milk seemed to be a suitable test food of a calcium-rich type, which is of importance in connexion with fluoride ingestion.

It was thought that enzymes of the milk or its cells might split some of the fluorophosphate dissolved in the milk and thus introduce a source of error in the judgment of the metabolic fate *in vivo* of this ion. This hypothesis was tested in an experiment with six rats, of which three received the standard administration of double labelled $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ in ordinary market milk (to be described in the following section), and three the same milk that had been boiled before addition of this salt. Blood samples were drawn after 5 min (tail) and 4 hr (heart) and the femurs and collected urine were also analysed after 4 hr.

This test revealed no significant or consistent differences between boiled and unboiled milk according to the above parameters.

In six animals receiving the same standard dose of double labelled $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ in milk the stomach contents were removed after half an hour and analysed radiometrically after determination of the pH values. The pH values varied between 5.50 and 5.79. The P^{32} activities at standard time varied between 15.3 and 19.9 per cent of the corresponding F^{18} activities, average 17.6 per cent, while the same percentage for the $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ in the administered milk was 18.0.

Thus milk seemed to be a suitable type food for the ingestion with sufficient buffer capacity to prevent acid hydrolysis of the PO_3F ion in the stomach.

The labelled fluorides were dissolved in milk to the desired concentrations immediately before the ingestion. Every animal was given 5 ml of the milk solution directly into the stomach through a rubber tube, immediately followed by the same volume of ordinary milk; the labelled fluoride remaining in the syringe and the tube was thus rinsed down.

If the urinary fluoride excretion was to be tested, the rat was placed in a metabolism cage with an arrangement that permitted the collection of the urine uncontaminated by faeces. Aliquots of the urine produced during the rat's survival time were weighed in counting tubes before analysis.

In some cases blood samples were taken from the tail 5 min after ingestion. It was found convenient to cut off a piece of the tail, wipe off possible bone fragments and then let the blood drip into a counting tube. After this the wound was bandaged for the rest of the rat's survival time.

At the termination of the chosen survival time the rat was ether anaesthetized and opened. Blood was drawn with heparinized syringes from the heart, and in some cases from the portal vein, and transferred into the counting tubes for weighing. The animal was then immediately killed by stretching the spine. The digestive canal with its contents was taken out and weighed. The right femur was removed, dissected free from soft tissues, placed in a counting tube and weighed.

After weighing, the digestive canal was thoroughly homogenized and a 2 ml sample transferred to a counting tube and weighed.

All samples were brought to standard geometry and analysed radiometrically as described in the preceding section.

F^{18} AND P^{32} DISTRIBUTION AFTER INGESTION OF DOUBLE LABELLED SODIUM MONOFLUOROPHOSPHATE

The rats used for this experimental series weighed about 300 g. Every animal received 5 ml 50-mM Na_2PO_3F in milk according to the previously described technique. The F^{18} and P^{32} distribution was studied in the blood, femur, urine and digestive tract up to 6 hr after the ingestion.

Results

1. Blood

The F^{18} and P^{32} activities of the heart blood appear from Fig. 2. Every point in this and the following diagrams of this section represents the average of at least six animals. The differences between the percentages of the two isotopes were significant at all time intervals except after 4 hr. It is evident already from this diagram that the monofluorophosphate must be split to a great degree in the animal body.

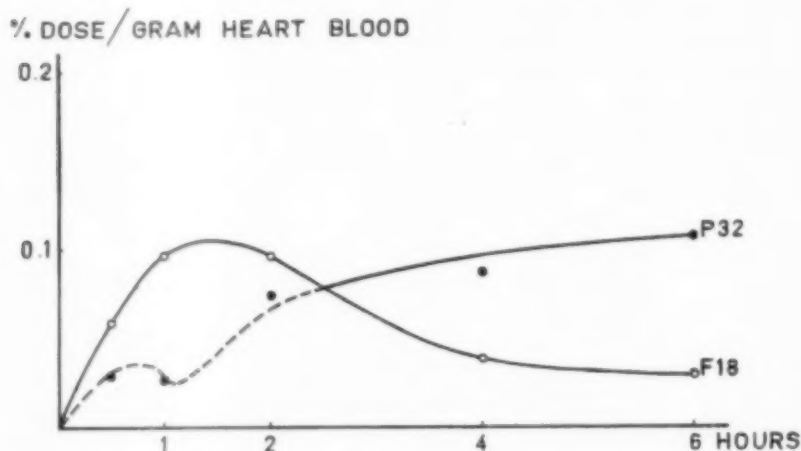


FIG. 2. F^{18} and P^{32} in heart blood at different time intervals after the ingestion of double labelled sodium monofluorophosphate (5 ml 50-mM Na_2PO_3F in milk).

The broken part of the P^{32} curve denotes that this course is not justified by the points themselves. However, the curve is drawn in analogy with the results of the orthophosphate-monofluorophosphate experiments to be reported later (Fig. 6).

The splitting of the PO_3F ion seems to be a very rapid process according to the F^{18} and P^{32} contents found in the tail blood of six rats 5 min after the ingestion (averages, F^{18} 0.027, P^{32} 0.008 per cent of dose per gram blood, difference significant).

During the work the idea arose that a comparison of the F^{18} and P^{32} contents of the portal blood and the heart blood might cast some light on the roles of the intestinal mucosa and/or the digestive juices in the disintegration of the monofluorophosphate ion. In experiments with 1-6 hr survival time blood was therefore drawn from the portal vein immediately before sampling from the heart.

The portal blood was naturally higher in the absorbed isotopes than the heart blood, except regarding the phosphorus after 6 hr; after this time interval we may assume a considerable incorporation of P^{32} in the blood lipids. However, the ratios $\text{F}^{18}:\text{P}^{32}$ were not significantly different in the heart and portal blood at any time interval and thus did not permit any conclusion on the metabolic fate of the PO_3F ion in the intestine.

2. Femur

The incorporation of F^{18} and P^{32} in the femur follows quite different curves (Fig. 3). The F^{18} uptake is rapid and reaches a maximum level 4 hr after the ingestion, exactly as after ingestion in the form of fluoride ion (ERICSSON, 1958). The P^{32} uptake is slower and continues to rise during the whole observation period. This is further proof of the splitting of the PO_3F ion in the body.

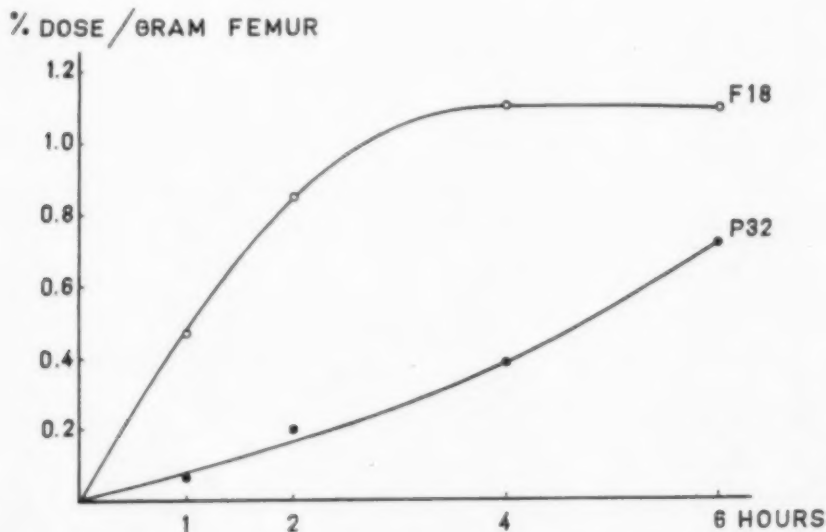


FIG. 3. F^{18} and P^{32} in femur at different time intervals after the ingestion of double labelled sodium monofluorophosphate (5 ml 50-mM $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ in milk).

It may be mentioned that the fluoride uptake per gram femur was found to be much greater in rats weighing about 50 g less than these rats, evidently owing to the much more rapid growth and bone turnover of these lighter rats. This is in good agreement with earlier findings on bone growth and fluorine uptake (GLOCK, LOWATER and MURRAY, 1941; ARMSTRONG, 1946; SUTTIE and PHILLIPS, 1959).

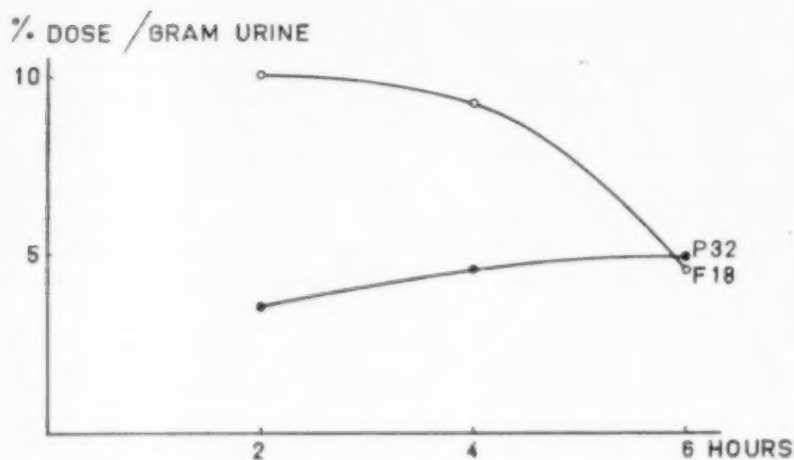


FIG. 4. F^{18} and P^{32} in urine at different time intervals after the ingestion of double labelled sodium monofluorophosphate (5 ml 50-mM Na_2PO_3F in milk).

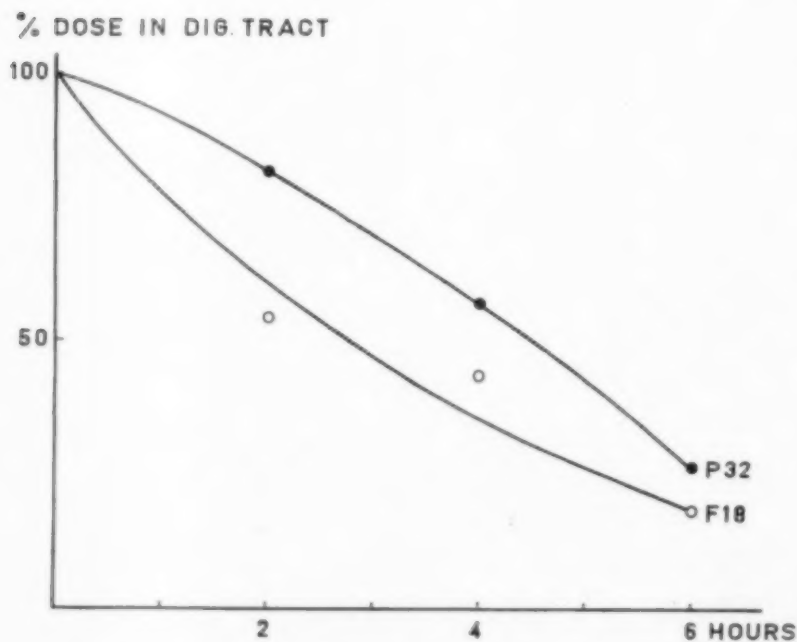


FIG. 5. F^{18} and P^{32} in digestive tract at different time intervals after ingestion of double labelled sodium monofluorophosphate (5 ml 50-mM Na_2PO_3F in milk).

3. Urine

The F^{18} and P^{32} contents per gram of the urine collected after 2, 4 and 6 hr showed considerable individual variation, probably in part owing to differences in the degree of filling of the bladder at the beginning and end of the experiments. Fig. 4 gives the average excretion during the whole experimental periods of the 2, 4 and 6 hr animals, respectively. This implies that the changes of excretion per unit time must have been more rapid than those of the curves. F^{18} was excreted much more rapidly than P^{32} , the differences being significant at the 2 and 4 hr intervals.

4. Digestive tract

The total contents of the digestive tract at different time intervals are given in Fig. 5. The difference $\text{P}^{32} - \text{F}^{18}$ is significant at the 2 and 4 hr intervals. This difference may be due to splitting of the monofluorophosphate and more rapid absorption of liberated fluoride, or in part to re-excretion of labelled phosphate with the digestive juices, where fluoride is hardly excreted (ZIPKIN *et al.*, 1958; ERICSSON and ULLBERG, 1958).

P^{32} ACTIVITY IN HEART BLOOD, PER CENT OF DOSE/G.

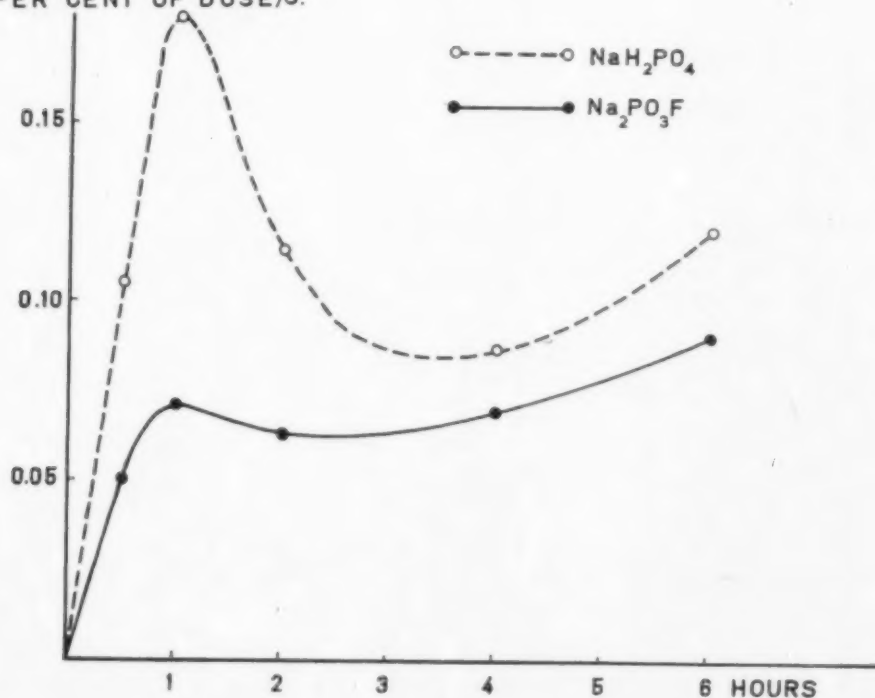


FIG. 6. P^{32} in heart blood at different time intervals after the ingestion of labelled monofluorophosphate and orthophosphate, respectively (5 ml 50-mM salt in milk).

PHOSPHORUS ABSORPTION FROM MONOFLUOROPHOSPHATE
AND ORTHOPHOSPHATE

It was thought to be of interest to compare the phosphorus absorption from $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ with that from ordinary orthophosphate. For this purpose $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ and NaH_2PO_4 were P^{32} -labelled and dissolved in milk to 50-mM concentrations, according to previously described methods. Dihydrogen phosphate was used in order to prevent as far as possible the precipitation of calcium phosphate in the milk; the resulting pH of the milk was about 5.9. Rats with an average weight of about 290 g were given each 5 ml of one of these solutions.

Rats receiving the same ingestion were kept groupwise in metabolism cages where their urine was pooled. They were killed at varying time intervals up to 6 hr after feeding and samples of the heart blood were taken for analysis. From the 1 hr rats the right femur was also taken for analysis, and from the 2, 4 and 6 hr rats the digestive canal.

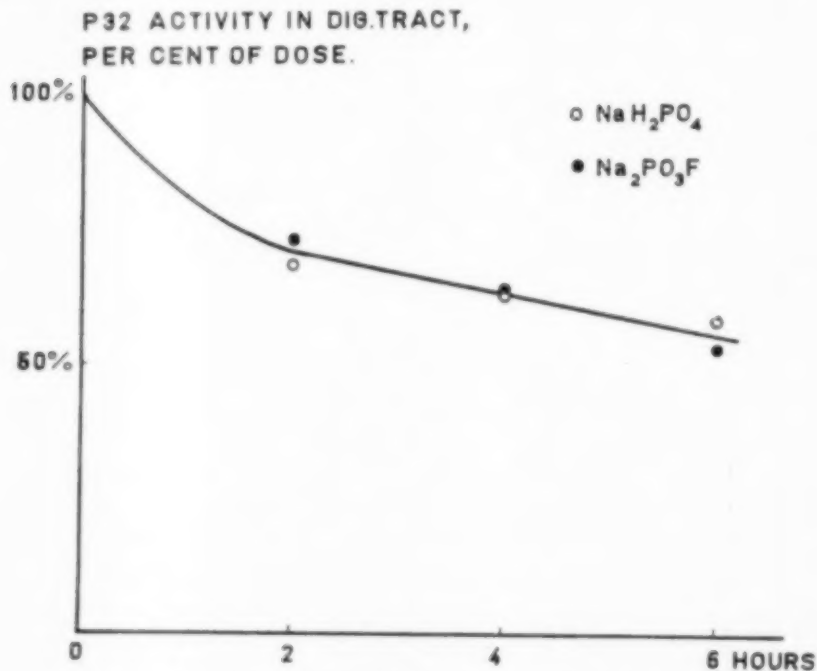


FIG. 7. P^{32} in digestive tract at different time intervals after the ingestion of labelled monofluorophosphate and orthophosphate, respectively (5 ml 50-mM salt in milk).

Results

The P^{32} contents found in the heart blood and digestive canal appear from Figs. 6 and 7. Each point in the diagrams represents the average of three or four animals. The differences between corresponding points on the two blood curves were significant up to 2 hr.

The P^{32} uptake per gram of the femur after 1 hr was 0.56 per cent of the dose given as orthophosphate, 0.28 per cent of the dose given as monofluorophosphate. The urinary P^{32} excretion could not be measured with good precision in this series, but at the 4 and 6 hr intervals it appeared to be about 50 per cent greater after NaH_2PO_4 than after $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$.

There was thus a more rapid phosphate absorption from the orthophosphate. Re-excretion with the digestive juices may possibly account for the absence of significant differences in the digestive tract. The initial peak of the blood curves is clearly due to the absorption maximum while the later rise should be due to the gradual incorporation of P^{32} in the blood lipids.

F^{18} METABOLISM AFTER INGESTION AS $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ AND NaF , RESPECTIVELY

It seemed of interest to compare the metabolism of fluoride when ingested as $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ and NaF , respectively. This was done in experiments:

- (1) with 25-mM solutions of the salts in milk and with survival times of 1 and 4 hr;
- (2) with 5-mM solutions in 0.1-M citrate buffer pH 5.5 and 1 hr survival time;
- (3) with 2.5-mM solutions in 0.1-M acetate buffer pH 5.0 and 1 hr survival time.

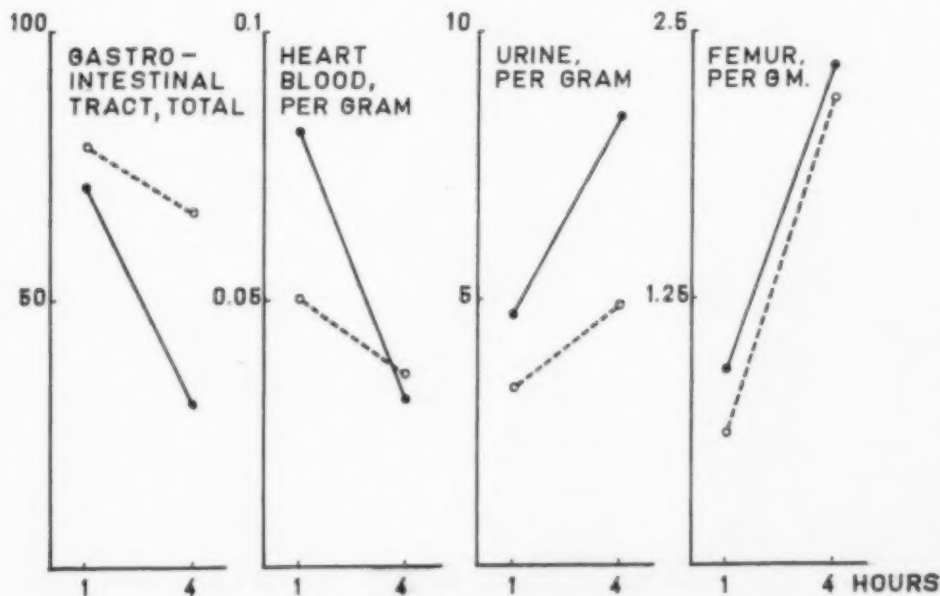


FIG. 8. Distribution of F^{18} 1 and 4 hr after the ingestion as labelled sodium monofluorophosphate and sodium fluoride, respectively (5 ml 25-mM salt in milk).

Distribution of F^{18} as $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ ●—●, % dose.

Distribution of F^{18} as NaF ○---○, % dose.

Both salts were labelled with F^{18} . 5 ml of a 25-mM solution of sodium fluoride as peroral dose to a 275 g rat is about one tenth of the LD 50, and the toxicity should be lower still when given in milk, as in this case. No toxic signs were seen in any of these experiments. The methods of administration and sampling followed the standard technique as described. In Experiment 1, groups of six animals were used; in Experiment 2, groups of three animals; in Experiment 3, groups of four animals. The rats used in these experiments were all below 300 g weight.

Results

1. The results of the experiment with 25-mM solutions in milk are condensed in Fig. 8.

A *t*-test on the differences appearing from the diagram revealed the following significance, expressed as the *P*-values.

TABLE 1

	1 hr	4 hr
Gastro-intestinal tract	0.02-0.05	0.01-0.001
Heart blood	0.001	0.4
Urine	0.3	0.02-0.05
Femur	0.01-0.001	0.3

The absorption of F^{18} was thus more rapid, and after 4 hr much more complete, from monofluorophosphate than from fluoride.

2. The average results of the experiment with 5-mM solutions in citrate buffer appear from Table 2.

TABLE 2. F^{18} -DISTRIBUTION 1 hr AFTER INGESTION AS Na_2PO_3F AND NaF , RESPECTIVELY, IN 0.1-M CITRATE BUFFER pH 5.5

	Na_2PO_3F	NaF
Heart blood (% dose/g)	0.18	0.16
Femur (% dose/g)	1.05	1.05
Digestive tract (% dose totally)	40.6	39.5

There was no significant difference between the F^{18} absorption from monofluorophosphate and that from fluoride when both salts were given in citrate solutions and at lower concentrations.

3. The average results of the experiment with 2.5-mM solution in acetate buffer appear from Table 3.

TABLE 3

	$\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$	NaF
Heart blood (% dose/g)	0.17	0.15
Femur (% dose/g)	1.03	0.84
Digestive tract (% dose totally)	44.2	51.5

The group differences were larger in this series than in the previous one, especially as regards femoral uptake and intestinal residue. These differences were not statistically significant ($P=0.1-0.2$); however, they all went in the same direction as the differences found between $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ and NaF administered with milk.

The results make it probable that the delayed absorption of fluoride from milk is due to the precipitation of calcium fluoride in the stomach and intestine. The calcium-binding citrate prevents this precipitation, while the calcium ions of the digestive juices appear to be sufficient to precipitate some of the fluoride ingested in acetate buffer. Calculations based on the solubility product of calcium fluoride support these concepts.

DISCUSSION

The results demonstrate that the reported lower peroral toxicity of monofluorophosphate cannot be due to any slower absorption rate but must have another explanation; it appears possible that a gradual liberation of fluoride ions from the monofluorophosphate is balanced by their excretion and skeletal sequestration. While the splitting of the monofluorophosphate has been demonstrated, the mechanism and rapidity of this process remain to be established.

The absence of toxic signs in the reported experiments with relatively high doses of monofluorophosphate and fluoride is of special interest. The F^{18} content of 1 g of heart blood 1-2 hr after the ingestion as $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$, as seen in Fig. 2, corresponds to about 4.75 p.p.m. total F derived from the ingested $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$. This is about 20 times the normal fluoride content of the rats' blood. In this case the absence of toxic signs might be partially explained by incomplete splitting of the PO_3F ion. The blood content of 0.05 per cent of the dose of F^{18} -labelled NaF , as found in Fig. 8, corresponds to a blood fluoride increment of about 1.2 p.p.m. or 4-5 times the normal content. Still the rats displayed no evident toxic signs.

If the fluorine absorbed from $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ is transported by the blood in part as PO_3F ions, the bone tissue must be assumed either to take up these ions directly or to liberate and take up fluoride from them. These would be the only apparent explanations of the equal fluorine uptake by the femur, which was found when F^{18} was ingested as $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ or NaF in citrate buffer.

Further study of the metabolism and physiological effect of the PO_3F ion seems indicated. If no good method for the determination of the PO_3F ion in biological material can be found, one suitable approach may be the study of the intra-vascular toxicity of $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ as compared with NaF .

From a practical viewpoint the results obtained in this investigation support the use of monofluorophosphate for caries-preventive fluorine administration, especially where this has to be done together with large or varying quantities of calcium.

Acknowledgements—Our thanks are due to several technical collaborators, especially Mr. OLOF EKBERG and Mr. HANS SUNDBERG. The solubility diagram Fig. 1 was kindly supplied by Professor ARNE ÖLANDER. The investigation was financially supported by the Swedish Medical Research Council.

REFERENCES

- ARMSTRONG, W. D. 1946. Bone growth in paralyzed limbs. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* **61**, 358–362.
- BURNETT, G. W. 1955. The effect of fluorides on the organic and inorganic components of intact dentin. *J. dent. Res.* **34**, 489–501.
- COSTICH, E. R. *et al.* 1957. Reduction of hamster periodontal disease by sodium fluoride and sodium monofluorophosphate in drinking water. *J. Amer. dent. Ass.* **55**, 617–619.
- ERICSSON, Y. 1958. The state of fluorine in milk and its absorption and retention when administered in milk. *Acta odont. scand.* **16**, 51–77.
- ERICSSON, Y. 1961a. Double labelling of sodium monofluorophosphate with P^{32} and F^{18} . *Int. J. appl. Rad. Isotop.* In press.
- ERICSSON, Y. 1961b. Fluorides in dentifrices. Investigations using radioactive fluorine. *Acta odont. scand.* **19**. In press.
- ERICSSON, Y. and ULLBERG, S. 1958. Autoradiographic investigations of the distribution of F^{18} in mice and rats. *Acta odont. scand.* **16**, 363–372.
- GLOCK, G. E., LOWATER, F. and MURRAY, M. M. 1941. The retention and elimination of fluorine in bones. *Biochem. J.* **35**, 1235–1239.
- HAWES, R. R., SONNES, S. and BRUDEVOLD, F. 1954. Pilot studies of three topical fluoride application procedures. *J. dent. Res.* **33**, 661.
- HAYDON, G. B., HEIN, J. W. and GARDNER, D. 1951. Preliminary investigations of the effect of sodium monofluorophosphate on salivary acid production and hydroxy apatite solubility. *J. dent. Res.* **30**, 466.
- HEIN, J. W. *et al.* 1951. Further studies of the caries inhibitory potential and acute toxicity of complex fluorides. *J. dent. Res.* **30**, 466.
- HEIN, J. W., MARCUSSE, H. W. and QUIGLEY, G. 1957. Comparative effect of Na_2FPO_3 and NaF on erupting incisors. I.A.D.R., 35th Gen. Meet., preprint. abstr.
- JIRASKOVA, M. and RUZICKA, J. 1960. Die Bedeutung des Ammoniummonofluorophosphates zur Vorbeugung der Zahnkaries. *Deutsch. zahnärztl. Z.* **15**, 1563–1567.
- LANGE, W. 1929. Ueber die Monofluorophosphorsäure und die Ähnlichkeit ihrer Salze mit den Sulfaten. *Ber. chem. Ges. Frankfurt* **62**, 793–801.
- LARGENT, E. J. and HEYROTH, F. F. 1949. The absorption and excretion of fluorides—III. *J. Industr. Hyg.* **31**, 134–138.
- SANTESSON, G. 1957. Aspects of salt fluoridation. *Odont. Revy, ORCA Suppl.*, pp. 191–198.
- SHOURIE, K. L., HEIN, J. W. and HODGE, H. C. 1950. Preliminary studies of the caries inhibiting potential and acute toxicity of sodium monofluorophosphate. *J. dent. Res.* **29**, 529–533.
- SUTTIE, J. W. and PHILLIPS, P. H. 1959. The effect of age on the rate of fluorine deposition in the femur of the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 355–359.
- ZIPKIN, I. and MCCLURE, F. J. 1951. Complex fluorides: caries reduction and fluorine retention in the bones and teeth of white rats. *Publ. Hlth Rep., Wash.* **66**, 1523–1532.

ORGANISCHE PHOSPHATE IM MENSCHLICHEN SPEICHEL

G. AHRENS und B. RANKE

Isotopenlaboratorium der Universitätsklinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten, Hamburg, Deutschland

Zusammenfassung—Es wird eine säulenchromatographische Methode beschrieben, die die Trennung von Phosphatestern und einiger Nucleotide im menschlichen Speichel erlaubt. Vorläufige Ergebnisse deuten auf Unterschiede von ATP, ADP und FDP in Speicheln Kariesanfälliger und Kariesresistenter hin.

Abstract—A column chromatographic method is described which permits the separation of phosphate esters and some nucleotides in human saliva. Preliminary results point to differences in the amounts of ATP, ADP and FDP in saliva of caries-resistant and caries-susceptible individuals.

Résumé—Une méthode chromatographique sur colonne qui permet la séparation des esters phosphoriques et de quelques nucléotides dans la salive humaine, est décrite. Les résultats préliminaires semblent montrer qu'il y a des différences dans la teneur en ATP, ADP et FDP de la salive des individus sujets aux caries dentaires et des individus résistants.

BISHERIGE Ergebnisse der Untersuchungen von mit Glukose inkubiertem Speichel kariesresistenter und -anfälliger Personen zeigten zum Teil erhebliche Unterschiede in Sauerstoffverbrauch und Enzymaktivitäten (BRAMSTEDT und VONDERLINN, 1953; BRAMSTEDT *et al.*, 1954; KRÖNCKE und NAUJOKS, 1954) und liessen entsprechende Unterschiede im Phosphatstoffwechsel, der aufs engste mit dem System der Energiegewinnung verknüpft ist, erwarten. Die gegenwärtige vorläufige Mitteilung soll von Arbeiten berichten, die im Rahmen der erwähnten Untersuchungen im Speichel ablaufender Stoffwechselvorgänge begonnen wurden und eine Bestandaufnahme der organischen Phosphatverbindungen zum Gegenstand haben. Es soll damit zunächst eine der Voraussetzungen geschaffen werden, Einblick in die Probleme der Phosphorylierung und des Energiehaushaltes im Speichelmilieu zu gewinnen.

MATERIAL

Als Material diene Nüchternspeichel, der reizlos in einer Menge von 5 ml unmittelbar nach dem morgendlichen Erwachen von jedem Probanden produziert und kühl gehalten wurde. Die Einstufung der Probanden in die Gruppe der kariesresistenten bzw.-anfälligen Personen geschah biochemisch nach dem Prinzip der

Messung der Sauerstoffaufnahme (KRÖNCKE and NAUJOKS, 1954) und nach dem klinischen Bild.

METHODEN

Je 4 Speichelproben der gleichen Kategorie wurden vereinigt, zur Enteiweissung mit Perchlorsäure versetzt bis zur Endkonzentration von 3,5 %, zentrifugiert (15000 U/min) und in der Kälte neutralisiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der klare Überstand auf eine Säule von 0,3×70 cm, beschickt mit Dowex 2, X10, 200–400 mesh, Chloridform, aufgebracht, welche durch Leitungswasser gekühlt wurde. Die Elutionsmittel sind die von KHYM und COHN (1953) angegebenen. Die Fließrate betrug bei einem Druck von etwa 1,7 at. 40 ml/h. Die durch die Säule gelaufenen Elutionsmittel wurden mit einem Fraktionsammler in Fraktionen zu je 11 ml unterteilt. Auf diese Weise setzte sich jedes Chromatogramm aus etwa 500 Proben zusammen. Eluate, in denen Nucleotide zu erwarten waren, wurden im Spektralphotometer bei der Wellenlänge 260 m μ gemessen. Dem Einengen der Proben bei 105°C bis zur Trockne schloss sich die Gesamtposphatbestimmung nach LOWRY *et al.* (1954) an. Die Extinktionen der Absorption im UV-Bereich bei 260 m μ und der Gesamtposphatbestimmung bei 578 m μ , aufgetragen in Abhängigkeit zur Menge des durchgelaufenen Lösungsmittels, ergaben das Chromatogramm.

ERGEBNISSE

Ein repräsentatives Chromatogramm menschlichen Speichels zeigt Abb. 1. Es sind deutlich 10 Gipfel zu unterscheiden. Die Identität der Gipfel ist bis auf einen (X) durch Mitlaufenlassen von Vergleichssubstanzen im Mischchromatogrammverfahren sichergestellt. Auffallend ist der mengenmässig grosse Unterschied zwischen anorganischem Phosphat und den verschiedenen organischen Phosphatverbindungen. Das Verhältnis auf dem Chromatogramm ist etwa 15:1.

Die augenfälligsten Unterschiede der Chromatogramme kariesresistenter und -anfälliger Speichel ergaben sich im Gehalt von AMP, ADP, ATP und FDP, der sich bei den kariesanfälligen erniedrigt zeigte. Die Mittelwerte der Gehalte dieser Verbindungen, berechnet aus den bisher zur Verfügung stehenden Chromatogrammen, finden sich in dem Schema Abb. 2 gegenübergestellt. Sie repräsentieren je 12 Speichelproben. Die Beobachtungen bezüglich ATP und FDP bestätigen die von EGGERSLURA (1956) gewonnenen Ergebnisse seiner papierchromatographischen Speicheluntersuchungen.

DISKUSSION

Die angewandte Methode zeichnet sich gegenüber der papierchromatographischen durch bessere Trennschärfe und grössere Empfindlichkeit aus. Der Nachteil der Methode liegt in dem erheblichen Arbeitsaufwand und in der längeren Zeitdauer eines Säulenchromatogramms. Der Durchlauf der neun Elutionsmittel beansprucht 6 Tage. An einer Abänderung der Methode mit dem Ziel, die Zersetzungsgefahr zu verringern, wird gearbeitet.

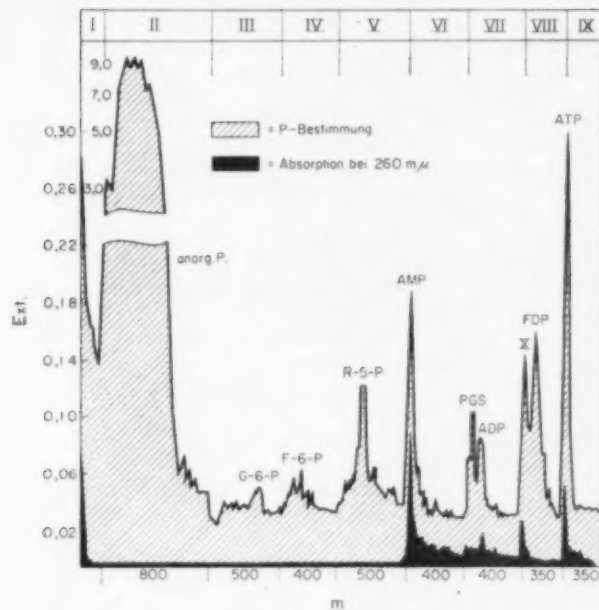


Abb. 1. Chromatogramm organischer Phosphatverbindungen des menschlichen Speichels. Waagrecht sind oben die Nummern der Elutionsmittel, unten die benötigten Mengen angegeben. Abkürzungen: anorg. P. = anorganisches Phosphat. G-6P = Glukose-6-Phosphat. F-6-P = Fruktose-6-Phosphat. R-5-P = Ribose-5-Phosphat. AMP = Adenosinmonophosphat. PGS = Phosphoglycerinsäure. ADP = Adenosindiphosphat. FDP = Fruktose-1,6-Diphosphat. ATP = Adenosintriphosphat.

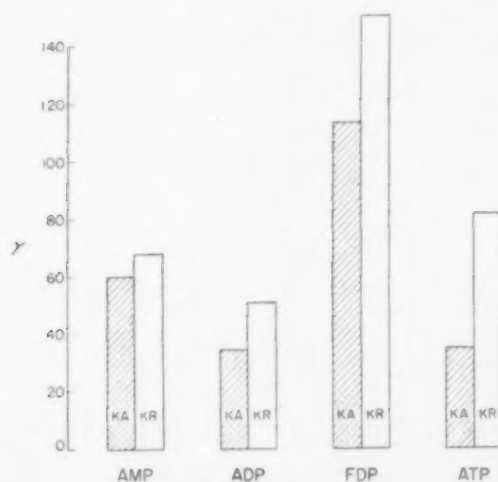


Abb. 2. Verhältnis einiger Phosphatverbindungen in Speichelchromatogrammen von Kariesanfälligen und Kariesresistenten.

LITERATUR

- BRAMSTEDT, F., KRÖNCKE, A., NAUJOKS, R. und VONDERLINN, R. 1954. Die Verbrennung organischer Substrate im Speichel kariesresistenter und kariesanfälliger Personen. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **9**, 782-791.
- BRAMSTEDT, F. und VONDERLINN, R. 1953. Die Biochemie des Speichels in ihrer Beziehung zur Ernährung und Zahnkaries. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **8**, 69-71.
- EGGERS LURA, H. 1956. Papierchromatographische Untersuchungen über den Gehalt an labilem, energiereichem Phosphat im Speichel von kariesresistenten und kariesaktiven Versuchspersonen. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **11**, 70-75.
- KHYM, J. X. und COHN, W. E. 1953. The separation of sugar phosphates by ion exchange with the use of the borate complex. *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 1153-1156.
- KRÖNCKE, A. und NAUJOKS, R. 1954. Weitere Ergebnisse zur Entwicklung eines biochemischen Kariestes. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **9**, 565-567.
- LOWRY, O. H., ROBERTS, N. R., LEINER, K. Y., WU, M. L. und PFARR, A. L. 1954. The quantitative histochemistry of brain—I. Chemical methods. *J. biol. Chem.* **207**, 1-5.

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER ALDOLASEAKTIVITÄT DES SPEICHEL UND DER KARIES*

R. NAUJOKS, F. BRAMSTEDT, E. RANKE und A. KRÖNCKE

Biochemisches Laboratorium
der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
und Physiologisch-chemisches Institut
der Universität Hamburg

Zusammenfassung—Mit Hilfe enzymatischer Methoden werden im Speichel karies-resistenter und kariesanfälliger Personen

- (a) der Verlust an "wahrer" Glukose,
- (b) der Verlust an anthronpositiven Substanzen,
- (c) die Aldolaseaktivität und mit der Manometertechnik (Warburg),
- (d) der Sauerstoffverbrauch des Speichels pro Stunde bestimmt.

Es wird festgestellt, dass die erzielten Werte bei Kariesresistenten ca. dreifach so hoch liegen wie bei Kariesanfälligen.

Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen die von anderer Seite durchgeführten Untersuchungen, wonach die Eliminationsgeschwindigkeit der Zucker aus der Mundhöhle Kariesanfälliger verlangsamt ist. Auf die Bedeutung der Aldolaseaktivität in ihren möglichen Beziehungen zur Kariesätiologie wird hingewiesen.

Abstract—By means of enzymatic methods, the following points are determined in saliva of caries resistant and caries susceptible individuals:

- (a) the decrease of "true" glucose,
- (b) the decrease of anthrone-positive substances,
- (c) the activity of aldolase and by means of manometric techniques (Warburg),
- (d) the oxygen consumption of saliva during 1 hr.

The authors state that the values in caries resistant saliva are three times higher than those in caries susceptible individuals.

The results confirm former investigations in which a longer elimination time of sugar from the mouth of caries-susceptible than in caries-resistant individuals was found. The significance of aldolase-activity and its possible relation to the etiology of dental caries is discussed.

Résumé—A l'aide de méthodes enzymatiques, les auteurs ont étudié les points suivants dans la salive d'individus sujets et résistants à la carie:

- (a) la diminution du glucose "vrai"
- (b) la diminution des substances anthrone-positives
- (c) l'activité aldolasique
- (d) la consommation en oxygène de la salive pendant une heure à l'aide des techniques manométriques (Warburg).

* Die Untersuchungen wurden mit der freundlichen Unterstützung der Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Les valeurs ainsi obtenues chez des personnes résistantes à la carie sont environs trois fois plus élevées que chez des individus présentant de nombreuses caries.

Ces résultats confirment les investigations antérieures montrant que l'élimination des sucres de la cavité buccale est plus lente chez les personnes sujettes à la carie.

L'auteur discute la signification de l'activité aldolasique et son rapport possible avec la carie dentaire.

EIN GROSSER TEIL der Untersuchungen in der modernen biochemischen Kariesforschung wurden mit dem Ziel durchgeführt, tiefere Einblicke in die chemisch-parasitären Vorgänge zu gewinnen, die nach der Säuretheorie zur kariösen Zerstörung der Zahnhartsubstanzen führen. Hierbei konnte u.a. gezeigt werden, dass die Eliminationsgeschwindigkeit der Zucker aus der Mundhöhle kariesanfälliger Personen signifikant verlangsamt ist (GUSTAFSON *et al.*, 1952; LUNDQVIST, 1952; SWENANDER-LANKE, 1957) und ihren Ausdruck in einem statistisch gesicherten geringeren Sauerstoffverbrauch des Speichels der betreffenden Probanden finden kann (BRAMSTEDT und VONDERLINN, 1952; BRAMSTEDT *et al.*, 1954; KRÖNCKE und NAUJOKS, 1954; KRÖNCKE, 1959; NAUJOKS und VONDERLINN, 1953). Diese deutlichen Unterschiede zwischen kariesanfälligen (kA) und kariesresistenten (kR) Personen konnten jedoch keinen Hinweis dafür liefern, ob das schnellere Verschwinden der Zucker aus der Mundhöhle Kariesresistenter auf mechanische Ursachen, z.B. auf einen vermehrten Speichelfluss, oder auf biochemische Faktoren und demnach auf einen schneller ablaufenden Kohlenhydratstoffwechsel durch erhöhte Aktivität der daran beteiligten Fermente zurückzuführen ist.

Zur Aufklärung dieser Probleme bestimmten wir in unseren *In-vitro*-Untersuchungen im Speichel kariesresistenter und kariesanfälliger Personen

1. den Verlust an "wahrer" Glukose,
2. den Verlust an anthronpositiven Substanzen,
3. den Sauerstoffverbrauch des Speichels, und, da bei diesen Versuchen Hinweise dafür gefunden wurden, dass die Aldolaseaktivität des Speichels bei den beiden Probandengruppen unterschiedlich ist (NAUJOKS *et al.*, 1960), wurde auch
4. die Aldolaseaktivität des Speichels in unsere Untersuchungen mit einbezogen.

MATERIAL

Als Versuchsmaterial dienten Speichelproben von Personen, die auf Grund des klinischen Bildes, der Kariesanamnese und der klinischen Beobachtung während der letzten 1-2 Jahre und länger als deutlich kariesresistent oder sicher kariesanfällig bezeichnet werden konnten. Der Speichel wurde ohne Stimulation morgens unmittelbar nach dem Aufwachen, also vor dem Zähneputzen und dem Frühstück (Nüchternspeichel) und möglichst auch vor dem Verschlucken der ersten Speichelmengen nach dem Erwachen gewonnen. Nur solche Speichelproben geben unserer Auffassung nach ein deutliches Abbild der in der Mundhöhle vorhandenen Stoffwechsellage. Jede auf andere Weise erhaltene Speichelprobe führt zu stark abweichenden Ergebnissen (NAUJOKS *et al.*, 1961).

METHODEN

1. Bestimmung der "wahren" Glukose

Für die Untersuchungen benutzten wir den enzymatischen Test zur Blutzuckerbestimmung nach C.F. BOEHRINGER (TC-M-1, Nr. 15982).

Ansatz I (2 x)

- (a) 0,5 ml Speichel
- (b) 1,0 ml Veronalpuffer
(pH 7,0)
- (c) 1,0 ml H₂O

Ansatz II (2 x)

- (a) 0,5 ml Speichel
- (b) 1,0 ml Veronalpuffer
(pH 7,0)
- (c) 0,5 ml H₂O
- (d) 0,5 ml Glukoselösung
(4500 µg Glukose)

Je ein Ansatz I und II werden bei 37° C. für 60 Min. inkubiert.

Ansatz III

und

Ansatz IV

- | | |
|------------------------------------|------------------------------------|
| (a) 0,4 ml Ansatz I | (a) 0,1 ml Ansatz II |
| (b) 0,1 ml NaF (80 mg %) | (b) 0,4 ml NaF (20 mg %) |
| (c) 0,5 ml HClO ₄ (6 %) | (c) 0,5 ml HClO ₄ (6 %) |

Durch Umrühren gut mischen und bei ca. 3000 U/min 5–10 Min. zentrifugieren.

Ansatz III and IV werden ebenfalls zweimal angesetzt, wobei (a) einmal aus den inkubierten und einmal aus den nichtinkubierten Ansätzen I und II stammt.

0,2 ml Überstand von Ansatz III and IV werden mit 5,0 ml Glukosereagens (BOEHRINGER) vermischt und 35 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Extinktion dieser Testlösung wird im Fotometer Eppendorf bei 436 mµ und 10 mm Schichtdicke gemessen und die Differenz der Extinktion zu einem Blindwert (5,0 Glukosereagens+0,2 ml H₂O) bestimmt. Als Bezugswert dient eine Glukose-Standardlösung.

2. Bestimmung der anthronpositiven Substanzen (HOLT, 1954; MORRIS, 1958)

Ansatz

- 1,0 ml Speichel
- 1,0 ml Veronalpuffer (pH 7,0)
- 0,5 ml H₂O

bei 3000 U/min 5–10 Min. zentrifugieren.

1 ml des Überstandes mit 10 ml Anthronlösung in Eprovette mischen.
(Anthronlösung: 0,2 % Anthron in H₂SO₄ (78 %)).

Eprovette gut verschliessen, schütteln und genau 10 Min. in kochendes Wasserbad bringen, dann sofort im Eisbad kühlen.

Extinktion des entwickelten blau-grünen Farbstoffes bei 578 mµ und 5 mm Schichtdicke in Fotometer Eppendorf messen.

2. Glukosewerte einer angelegten Eichkurve entnehmen

Bei unseren Versuchen wurden dem Ansatz 4500 µg Glukose zugesetzt und der Gehalt des Ansatzes an anthronpositiven Substanzen vor und nach einstündiger Inkubation bei 37°C bestimmt.

3. Enzymatische Bestimmung der Aldolaseaktivität

Diese Untersuchungen wurden mit dem BOEHRINGER-Test (TC-D, Nr. 15974) (nach der Methode von BRUNS, 1954) durchgeführt. Bei dem Verfahren wird der Umsatz des DPN-H während der Spaltung von Fruktose-1,6-diphosphat in Glycerinaldehydphosphat und Dioxyacetonphosphat bestimmt. Dieser entspricht der gespaltenen Menge von FDP und zeigt die Aldolaseaktivität an. Die Bestimmung des DPN-H-Umsatzes erfolgt durch Extinktionsmessung im Fotometer Eppendorf bei 340 m μ . Einzelheiten sind der o.a. Testvorschrift zu entnehmen.

4. O₂-Verbrauch des Speichels

Die Sauerstoffaufnahme des Speichels wird mit Hilfe der Manometertechnik (Warburg-Apparat) bestimmt.

Ansatz

0,5 ml Speichel

1 ml Veronalpuffer (pH 7,0)

0,5 ml H₂O

in Zentralgefäß befinden sich 0,2 ml NaOH (10%), Versuchszeit 60 Min., Temperatur 37°C.

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind auf 1 ml Speichel umgerechnet.

ERGEBNISSE UND STATISTIK

Die Einzelergebnisse aus unseren Versuchsreihen sind in der Tabelle 1 wiedergegeben.

Der Verlust an "wahrer" Glukose und an anthronpositiven Substanzen entsprach pro ml Speichel (ursprünglich vorhandene Glukose bzw. anthronpositive Substanzen + 4500 μ g zugesetzte (umkristallisierte) Glukose) in der Zeiteinheit bei kariesresistenten Personen im Mittel 1517,3 \pm 210 μ g bzw. 1716,0 \pm 255 μ g Glukose und bei kariesanfälligen 457,7 \pm 84,8 μ g bzw. 588,2 \pm 86,1 μ g. Als Mittelwerte für die Aldolaseaktivität wurden bei Kariesresistenten 159,9 \pm 14,3 Einheiten nach BRUNS pro ml und Stunde und bei Kariesanfälligen 54,1 \pm 5,1 gefunden. Der O₂-Verbrauch des Speichels ergab für Kariesresistente einen Durchschnitt von 156,3 \pm 6,6 μ l für einen ml in der Stunde und bei Kariesanfälligen 43,4 \pm 2,9 μ l.

Trotz der relativ hohen Schwankungen bei den Einzelwerten innerhalb der verschiedenen Versuchsreihen war eine einwandfreie statistische Sicherung der Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen möglich.

Die statistischen Berechnungen führten wir nach dem Signifikanz-Test von FISHER (1956) durch.

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \cdot \left[\frac{\sum_1 (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum_2 (x_2 - \bar{x}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2} \right]^{-\frac{1}{2}} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)^{-\frac{1}{2}}$$

Bei einem Freiheitsgrad von mindestens 14 (bei 16 Einzelversuchen) bedeutet ein *t*-Wert von 2,977 schon eine 99-prozentige Sicherheit. *t*-Werte von 7,0; 9,3; 4,6 und 4,2 zeigen also die zweifelsfreie Signifikanz der Differenzen an.

Die Unterschiede zwischen kariesanfälligen und kariesresistenten Personen werden in der graphischen Darstellung der Abb. 1 noch einmal verdeutlicht. Bei einem Vergleich der Versuchsreihen untereinander zeigt es sich, dass die Differenzen zwischen kR und kA bei allen Mittelwerten einem Verhältnis von etwa 3:1 entsprechen.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Unsere Versuche zeigten, dass bei kariesanfälligen Personen nur etwa ein Drittel der Glukosemenge umgesetzt wird wie bei resistenten (Abb. 1). Durch enzymatische Bestimmung mit Hilfe der Glukoseoxydase konnte diejenige Menge an Glukose ermittelt werden, die in den Abbauweg eingeschleust wurde und durch Bestimmung der anthronpositiven Substanzen der Anteil, der über die Aldolasestufe hinaus

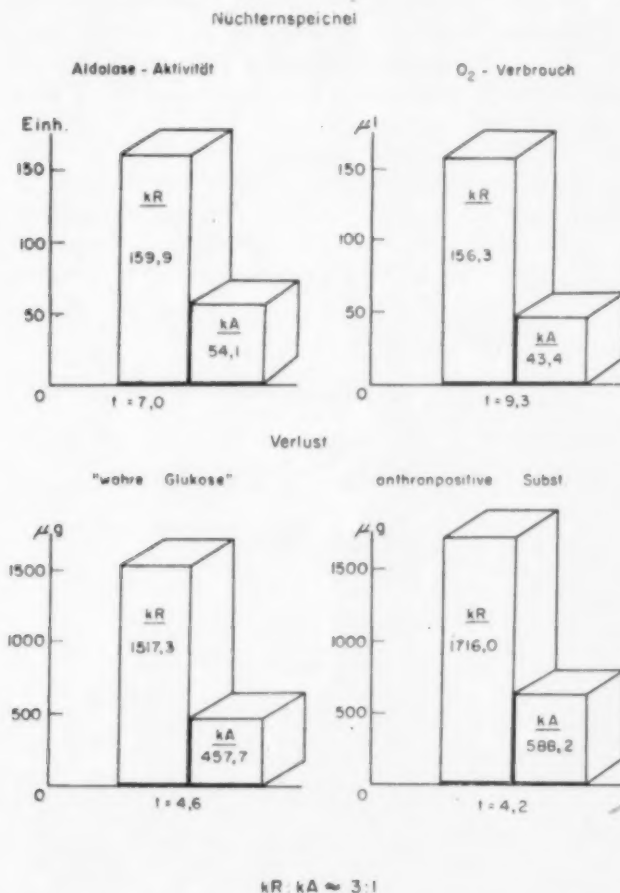


Abb. 1. Graphische Darstellung der Mittelwerte der erzielten Resultate bei kR- und kA-Personen. Das Verhältnis zwischen kR und kA beträgt bei allen Versuchsreihen etwa 3:1.

abgebaut worden ist. Die Berechnung der vollständig zu CO_2 und Wasser verbrannten Glukose zeigte aber, dass diese nur einen geringen Teil der den Stoffwechsel durchlaufenden Glukose ausmacht. Hieraus kann gefolgert werden, dass entweder ein grosser Teil in Form der Metaboliten des Embden-Meyerhof-Weges liegen geblieben ist oder über den Horecker Zyklus bzw. auf anderen bei Bakterien beschriebenen Wegen metabolisiert wurde.

In jedem Falle aber liegt die Vermutung nahe, dass bestimmte Fermente des Abbaufweges in Schlüsselposition, wie Hexokinase und Aldolase, in ihrer Aktivität gehemmt sein könnten. Durch die Untersuchungen von HOERMANN und ROBINSON (1957), die sich mit der Bestimmung, Kinetik und etwaigen Hemmstoffen der Speichelaldolase befassten, wurde festgestellt, dass individuelle Schwankungen bezüglich ihrer Aktivität vorkommen. Eine Beziehung zur Kariesanfälligkeit wurde weder untersucht noch diskutiert. Unsere Versuchsergebnisse über das Verschwinden der "wahren" Glukose und der anthronpositiven Substanzen deuteten darauf hin, dass die Aldolase bei dem unterschiedlich schnellen Abbau der Glukose im Speichel einen wichtigen Faktor darstellt.

Die bei anfälligen Personen beobachtete durchschnittliche Verminderung der Aldolaseaktivität auf ein Drittel im Vergleich zu der des Speichels resistenter Personen zeigt, dass bei jenen ein Block auf der Stufe der Fructose-1,6-diphosphat-Spaltung (FDP) in Glycerinaldehydphosphat (GAP) und Dioxyacetonphosphat (DOP) besteht (vergl. Abb. 2). Die Folge ist eine Anhäufung der Metaboliten des Abschnittes vom



Abb. 2. Glykolytischer Abbaufweg (EMBDEN-MEYERHOF) (aus KÜHNNAU und v. HOLT).

FDP bis zur Glukose, deren Anstau zu einem verringerten Abbau der zugegebenen Glukose führt. Unsere Versuche schliessen aber nicht aus, dass neben der Aldolase auch noch andere Fermente, z.B. die Hexokinase, die eine ähnlich zentrale Stellung

im Glukoseabbau einnimmt wie die Aldolase, in ihrer Aktivität gehemmt sind. Unsere Versuche geben ferner keine Auskunft darüber, ob die verminderte Aldolaseaktivität der Mundflora anfälliger Personen auf eine verminderte Synthese oder eine Hemmung durch besondere Inhibitoren zurückzuführen ist.

Die Versuche zeigen aber, dass die geringere Aldolaseaktivität zu einem verminderten Glukoseabbau im Speichel führen kann. Dies hat zur Folge, dass bei anfälligen Personen eine längere Verweildauer der in den Speichel eingebrachten Glukose zu beobachten ist. Die Plaques erhalten bei den anfälligen Personen längere Zeit ein höheres Angebot an Glukose durch den Speichel als resistente.

TABELLE 1. EINZELERGEBNISSE AUS DEN VIER VERSUCHEREIHEEN FÜR kR- UND kA-PERSONEN

M bezeichnet die Mittelwerte und die Standardabweichung, t den t -Wert nach dem Signifikanztest nach R. A. Fisher. ($t=2,977=99\%$ Sicherheit).

	Verlust an "wahrer" Glukose pro ml Speichel in 60 Min. (μ g)		Verlust an anthronpositiven Substanzen pro ml Speichel in 60 Min. (μ g)		Aldolaseaktivität pro ml Speichel in 60 Min. (Einheiten n. BRUNS)		O ₂ Verbrauch pro ml Speichel in 60 Min. (μ l)	
	kR	kA	kR	kA	kR	kA	kR	kA
1	990	440	1148	370	196,5	73,6	122,7	33,1
2	3018	290	2525	180	102,1	79,2	96,3	37,3
3	1640	352	1200	60	228,2	68,6	121,7	60,2
4	313	233	1225	770	149,4	75,8	160,0	47,5
5	1040	1360	1200	1247	78,0	59,0	135,5	48,0
6	1910	275	1900	350	283,5	27,8	245,5	38,1
7	2600	800	3640	1140	190,5	53,2	188,5	53,4
8	3275	90	1425	405	207,0	39,0	159,0	39,6
9	1780	160	1925	1540	73,6	46,1	177,5	61,0
10	1055	0	975	630	128,0	57,8	117,0	53,1
11	1980	690	1720	1075	103,0	58,5	104,0	25,4
12	710	440	4533	0	82,6	23,0	299,5	25,7
13	675	370	560	290	169,0	33,6	154,0	27,4
14	800	350	1070	330	194,0	64,4	131,0	41,0
15	1130	15	950	320	157,0	62,2	109,0	66,6
16	1360	310	1520	570	171,0	29,3	159,0	42,3
17		650		850	97,2	22,2	138,0	31,5
18		375		575	267,2	100,0	241,5	49,4
19		1525		405	224,0		155,0	
20		350		400	97,9		112,0	
21		915		845				
M =	1517,3 \pm 210	457,7 \pm 84,8	1716,0 \pm 255	588,2 \pm 86,1	159,9 \pm 14,3	54,1 \pm 5,1	156,3 \pm 6,6	43,4 \pm 2,9

$t=4,6$

$t=4,2$
kR = kariesresistent; kA = kariesanfällig

$t=7,0$

$t=9,3$

Die Schwankungen in der Aldolaseaktivität (vergl. Tab. 1) erklären die schon von LUNDQVIST (1952) und SWENANDER-LANKE (1957) beobachteten individuellen Unterschiede in der oral sugar clearance. Sie erlauben auch eine Deutung der bei den einzelnen Individuen beobachteten unterschiedlichen Kariesanfälligkeit. Die herabgesetzte Aldolaseaktivität im Speichel anfälliger Personen erhält damit in der Kariesätiologie besondere Bedeutung.

LITERATUR

- BRAMSTEDT, F. und VONDERLINN, R. 1952. Biochemische Speicheluntersuchungen—II. Die Sauerstoffaufnahme des Speichels und ihre Beziehungen zur Zahnkaries. *Zahnärztl. Welt* 7, 505–509.

- BRAMSTEDT, F., KRÖNCKE, A., NAUJOKS, R. und VONDERLINN, R. 1954. Biochemische Speicheluntersuchungen—VI. Die Verbrennung organischer Substrate im Speichel kariesanfälliger und kariesresistenter Personen. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **9**, 782–791.
- BRUNS, F. 1954. Bestimmung und Eigenschaft der Serum-Aldolase. *Biochem. Z.* **325**, 156–162.
- FISHER, R. A. In HODGMAN, C. D., WEAST, R. C. und SELBY, S. M. 1956. *Handbook for Chemistry and Physics*, 38. Ed. S. 215–217. Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio.
- GUSTAFSON, B. E. 1952. *Tandkaries ok Kolhydrater*. (Teamwork of the Medicinalstyrelsens odontologiska försöksstation Vipeholms sjukhus Lund). *Svensk tandläk. Tidskr.* **45**, Suppl.
- HOERMANN, K. C. und ROBINSON, W. E. 1957. On the determination of human saliva aldolase activity. *J. dent. Res.* **36**, 852–861.
- HOLT, C. VON 1954. Eine Methode zur Bestimmung des neutralen Hexoseanteils der Proteine des Blutserums. *Klin. Wschr.* **32**, 661–662.
- KRÖNCKE, A. und NAUJOKS, R. 1954. Biochemische Speicheluntersuchungen—V. Weitere Ergebnisse zur Entwicklung eines biochemischen Kariestestes. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **9**, 565–567.
- KRÖNCKE, A. 1959. *Freie Zucker im Menschlichen Nüchternspeichel*. Sammlung Meusser, Heft 40.
- KÜHNAU, J. und HOLT, C. VON 1957. Stoffwechsel der Kohlenhydrate. In Tannhausers *Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten* 2. Aufl. S. 217–286. Georg-Thieme, Stuttgart.
- LUNDQVIST, C. 1952. Oral sugar clearance. *Odont. Revy* **3**, Suppl. 1.
- MORRIS, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* **107**, 254–255.
- NAUJOKS, R. und VONDERLINN, R. 1953. Biochemische Speicheluntersuchungen—IV. Klinische Überprüfung der Möglichkeiten zur Entwicklung eines biochemischen Kariestestes auf der Grundlage des Sauerstoffverbrauchs des menschlichen Speichels. *Zahnärztl. Rdsch.* **62**, 438–441.
- NAUJOKS, R., BRAMSTEDT, F., RANKE, E. und AUERBACH, M. 1961. Zur Problematik der Speichelgewinnung für biochemische Untersuchungen. *Dtsch. zahnärztl. Z.* **16**, 171–175.
- NAUJOKS, R., BRAMSTEDT, F., RANKE, E. und KRÖNCKE, A. 1960. Beziehungen zwischen Aldolaseaktivität des Speichels und der Karies. *Naturwissenschaften* **47**, 187–188.
- SWENANDER-LANKE, L. 1957. Influence on salivary sugar of certain properties of foodstuffs and individual oral conditions. *Acta odont. scand.* **15**, Suppl. 23.

SOME SPECIAL FEATURES OF THE CARIES PREVENTIVE EFFECT OF WATER-FLUORIDATION

O. BACKER DIRKS, B. HOUWINK and G. W. KWANT

Organisation for Health Research T.N.O., Laboratory of Microbiology,
University of Utrecht, Utrecht, Netherlands

Abstract—In March 1953 water-fluoridation was started in Tiel, the Netherlands. From the caries numbers of three age classes the differences in caries inhibition for the various teeth and for the various tooth surfaces are shown after 5½ years of fluoridation.

The free smooth surfaces (buccal and labial) show an important caries reduction even if fluoridation started some years after the eruption of the tooth. If water-fluoridation is started 2 or 3 years before eruption the differences are hardly any greater.

Some proximal surfaces show a reasonable caries reduction if water-fluoridation is started shortly after eruption. The degree of protection seems partly determined by the accessibility of the surface for fluoride ions and the condition in the interproximal space. A pre-eruptive period with fluoridated drinking-water increases the effect substantially.

For the occlusal surface, only an insignificant effect was found if fluoridation was started after eruption. If fluoridation is started 2-3 years before eruption the caries inhibition was still about 50 per cent smaller than for the proximal surfaces. Only in those premolars and second molars which at the start of fluoridation were in an early stage of development, a larger caries inhibition for the occlusal surface was found.

The caries inhibition in the various surfaces seems to be correlated with the degree in which fluorine ions can be built in or absorbed by the enamel of these surfaces.

The degree of caries inhibition found will partly depend upon the methods used for the caries examination. In general, percentages of caries reduction tend to be higher if caries is diagnosed in a more advanced stage.

Résumé—En mars 1953, la fluoruration des eaux a été entreprise à Tiel (Pays-Bas). Les différences d'inhibition de la carie par rapport aux dents et aux surfaces dentaires dans trois groupes d'âges différents ont été déterminées après 5 ans et demi.

Une diminution importante des caries de surfaces vestibulaires est notée même sur des dents qui ont subi l'action du fluor plusieurs années après leur éruption. L'action du fluor de l'eau potable, 2 ou 3 ans avant l'éruption, ne semble pas entraîner une diminution plus grande.

Une certaine diminution du nombre des caries proximales est constatée, lorsque la fluoruration des eaux débute peu après l'éruption. Le degré de protection semble lié partiellement à l'accessibilité de la surface aux ions fluor et aux conditions existant dans l'espace interproximal. Cet effet de l'eau fluorée est notablement augmenté, si l'eau est consommée pendant la période pré-éruptive.

Pour les caries occlusales, seul un effet insignifiant fut observé lorsque la fluoruration est appliquée après éruption. Dans le cas d'une adjonction de fluor à l'eau 2-3 ans avant l'éruption, l'inhibition des caries est encore environ de 50 pour cent moins élevée que pour les surfaces proximales. Ce n'est qu'au niveau des prémolaires et secondes molaires, qui se trouvaient à un stade peu avancé de développement, au moment du début de la fluoruration, qu'une inhibition plus prononcée des caries occlusales fut observée.

L'inhibition de la carie des différentes surfaces dentaires semble en rapport avec le degré d'intégration ou d'absorption des ions fluor au niveau de l'émail de ces surfaces.

Le degré d'inhibition de la carie dépend partiellement des méthodes utilisées pour les examens des caries. En général les pourcentages de réduction ont tendance à devenir plus élevés, lorsque la carie est diagnostiquée à un stade plus avancé.

Zusammenfassung—Seit März 1953 ist das Wasser von Tiel (Niederland) fluoridiert. An Hand der Kariesdaten von drei Altersklassen wurden nach 5½ Jahre Trinkwasser-fluoridierung die unterschiedlichen Karieshemmungen auf die einzelnen Zahnflächen gezeigt.

Es stellte sich heraus, dass die Karieshemmung anscheinend korreliert ist mit dem Masse in dem Fluorionen in den Schmelz der bestimmten Flächen eingebaut oder absorbiert werden können. Diese Möglichkeit der Aufnahme von Fluorionen ist öfters ungleich für die einzelnen Flächen desselben Zahnes.

Es wurde gezeigt, dass der zahlenmässige Ausdruck der Karieshemmung abhängig ist von der Untersuchungsmethodik. Zahlenmässig wird die Karieshemmung desto grösser sein, umso später die Diagnose "Karies" gestellt wird.

INTRODUCTION

IN MARCH, 1953, a pilot fluoridation scheme was started in the Netherlands, in order to determine the caries preventive effect of water-fluoridation under Dutch living conditions. The town of Tiel was fluoridated (1.1 p.p.m. F) and the nearby town of Culemborg served as fluoride-free control (0.1 p.p.m. F).

The favourable effect of water-fluoridation on the dental caries experience in Tiel has been described elsewhere (HEALTH COUNCIL, 1960). In this communication attention will be paid to the differences in effect for the various surfaces of the teeth as manifest after 5½ years of fluoridation.

MATERIAL AND METHODS

To demonstrate the effect of fluoridation on caries initiation and progression, the caries data of three groups of children are selected, i.e. children born in 1945, 1946 and 1949. At the beginning of fluoridation their mean age was respectively 7½, 6½ and 3½ years.

Each age class consists of about fifty girls and fifty boys selected at random. All caries numbers to be presented are the mean values of the mean for the girls and the mean for the boys.

The methods used in the caries examination have been published elsewhere (BACKER DIRKS, VAN AMERONGEN and WINKLER, 1951; BACKER DIRKS and KWANT, 1954; BACKER DIRKS, KWANT and KLAASSEN, 1957). These methods aim at a careful and standardized caries examination. Special methods were used to prevent a shift in diagnostic standards from year to year. The examination comprised two parts:

1. An X-ray examination for the evaluation of the lesions of the proximal surfaces.
 2. A physical examination for the pit and fissure lesions of molars and premolars and for the lesions of the smooth free surfaces (buccal and labial only).
- Every examination is carried out twice, independently by two dentists. The standard error of the caries observation proved to be one tenth of the sampling error of the

group. The X-rays of fluoride and control group were mixed and a blind evaluation was made. In order to avoid a bias in the physical examination each half week the examination is shifted to the other town. The time devoted to the examination of an X-ray set is 6-10 min, and to the physical examination 5-20 min, depending upon the age of the children.

Caries numbers are either presented as all lesions observed or as the number of lesions with macroscopic cavitation in the physical examination and dentine involvement in the X-ray examination.

RESULTS

The differences in the kind of caries diagnoses between the proximal surfaces (X-ray examination) and smooth free surfaces (physical examination) make it impossible to add these numbers. The structural differences in occlusal surfaces and smooth surfaces also dictate a separate treatment of these numbers.

Particularly in a caries preventive study, separate treatment of the various kinds of surfaces is necessary as these may be influenced in different ways.

TABLE 1. CAVITIES PER CHILD, SEPARATELY FOR THE VARIOUS KINDS OF SURFACES, 1958

Year of birth	Age at start of fluoridation (years)	Age	Town	Number of cavities per child			
				Proximal (Inc. included)	Pits and fissures	Buccal and labial	Incisors proximal
1945	7½	13	Culemborg	5.2	11.4	1.0	1.6
			Tiel	3.6	9.6	0.4	1.0
1946	6½	12	Culemborg	3.9	10.0	0.9	1.7
			Tiel	2.0	7.8	0.3	0.6
1949	3½	9	Culemborg	0.9	5.7	0.5	0.25
			Tiel	0.3	4.1	0.2	0.05

In Table 1 the number of attacked surfaces per child is shown for the three types of surfaces separately and in Table 2 the percentage reduction in the number of cavities in the fluoride town.

Except for the second molar, all teeth of the 1945 and 1946 class were already calcified or even erupted at the start of fluoridation.

The caries reduction in the buccal and labial surfaces is larger than in the proximal surfaces, whereas the pit and fissures show the smallest effect.

As the teeth, even in one age class, were not in the same developmental stage at the start of fluoridation, the numbers given are in fact not very well comparable. For this reason Table 3 shows the caries numbers, only for the first molar, in the 1946 and 1949 class.

In both groups the buccal surfaces exhibit the largest effect, followed by the proximal surfaces, whereas the pits and fissures show the smallest effect.

TABLE 2. PERCENTAGE LESS CAVITIES IN TIEL AS COMPARED TO CULEMBORG, 1958

Year of birth	Age at start of water F (years)	Age (years)	Percentage less cavities in Tiel			
			Proximal (Inc. included)	Pits and fissures	Buccal or labial	Incisors proximal
1945	7½	13	31	16*	54	38
1946	6½	12	49	22	71	63
1949	3½	9	66	28	66	80*

* Difference not significant at the $P=0.01$ level.

TABLE 3

	Number of cavities per child			
	Pits and fissures*	Mesial surface	Distal surface	Smooth buccal surface
Age 12 (1946)				
Culemborg	6.7	1.5	1.1	0.40
Tiel	6.0	1.3	0.8	0.16
% difference	10†	13†	27	60
Age 9 (1949)				
Culemborg	5.8	0.8	0.4	0.41
Tiel	4.1	0.4	0.2	0.14
% difference	29	50	50	67

* In the maxillary molars the two fissures (mesio-buccal and disto-lingual) and in the mandibular the occlusal fissure and the buccal pit are counted separately.

† Difference not significant at the $P=0.01$ level.

The first molar of the children born in 1946 had already erupted at the start of fluoridation, the first molar of the 1949 class was calcified but only erupted 2 years later.

In the buccal surface there is for both age classes an important caries inhibition of about the same magnitude. The proximal surfaces of the 1949 class show both about the same caries inhibition, whereas the reduction in the 1946 class is not only smaller but also differs significantly for the mesial and distal surface. Only the occlusal surface of the molars of the children born in 1949 exhibit a significant caries inhibition.

The tables presented up to now dealt with cavities only (or dental lesions on the X-ray).

Table 4 gives for the proximal surfaces the number of lesions per child in two caries grades.

TABLE 4. PROXIMAL LESIONS PER CHILD, 1958

Age (years)	13		12		9	
Age at start of F	7½		6½		3½	
Caries grade	I-V	II-V	I-V	II-V	I-V	II-V
Culemborg	15.8	5.2	12.1	3.9	3.5	0.9
Tiel	12.5	3.6	8.7	2.0	1.9	0.3
% difference	21	31	28	49	46	66

I-V=all lesions; II-V=lesions with dentine involvement.

The percentage difference in cavities for each age class is much larger than for the total number of lesions. The same holds true for the fissure lesions, and the smooth surface lesions. The important difference in the number of dentinal lesions as compared with the total number of lesions diagnosed, is striking. The difference between the two numbers are the numbers of lesions confined to the enamel. In Culemborg there are twice as many enamel lesions as dentinal lesions, in Tiel three times more.

DISCUSSION

RUSSELL and WHITE (1959) found in a similar study a correlation between the observed caries inhibition and the length of fluoride exposure prior to eruption. Although in our material the same correlation is noted, the various surfaces of one tooth may show large differences in caries inhibition.

These differences in effect for the various surfaces point to the fact that a tooth index (e.g. DMF teeth) is in these cases less appropriate to describe caries inhibition than a surface index.

As caries inhibition seems to be caused by the degree of fluoride uptake by the enamel, we tried to understand the differences in caries inhibition of the various surfaces as an expression of a difference in fluoride uptake.

Three stages in which fluoride may enter the enamel can be differentiated. The first stage is the period of matrix formation and calcification, the second stage the period of pre-eruptive maturation and the third stage the post-eruptive period.

If fluoridation starts after eruption of a tooth, it seems that only those surfaces which are readily accessible to fluoride ions will show an increased caries resistance (Tables 2 and 3), i.e. the free smooth surfaces (buccal, labial) and those proximal surfaces where the diffusion route is short and convection current good (proximal surfaces of incisors). The distal surface of the first molar is at eruption also a free accessible surface as there is no adjacent tooth at that time. The conditions for fluoride adsorption on the mesial surface are especially poor. Directly after eruption this surface comes into contact with the distal surface of the second deciduous molar. Again the generally cariogenic milieu of this interproximal area will harm the physico-chemical conditions conducive to the uptake of ions. Also in the deep fissures and pits the uptake of ions will be difficult (Table 3, 1946 class).

During the pre-eruptive maturation period all smooth surfaces will incorporate fluoride ions in their outer layers, which results in an increased caries resistance. The smaller caries reduction in the occlusal surface of the first molar of the children born in 1949 (3½ years before the start of fluoridation) as compared with the caries reduction in the other surfaces, may be explained by the less favourable physical conditions (deep fissures) for the uptake of fluoride ions (Table 3). If fluoridation is started during matrix formation and calcification, all surfaces may acquire fluoride in equal amounts in this period; a different amount, however, during the pre-eruptive is started early, a smaller effect in the occlusal, than in the other surfaces. The fluoridation period in Tiel has not been sufficiently long to study enough teeth calcified during fluoridation. Especially for the fissures of first permanent molar and deciduous molars, one would expect a decreased inhibition, as these teeth are formed and partly calcified in a period with a small fluoride uptake by the foetus and the young child (pregnancy and lactation).

The smaller effect of fluoridation upon the number of all lesions as compared with the number of dentinal lesions proves that caries initiation as well as the rate of caries progression is reduced (Table 4). Also in those surfaces which received their fluoride only after eruption the rate of caries progression is markedly reduced.

The percentage of caries inhibition of enamel lesions in comparison with the inhibition of dentinal lesions points to the fact that every less extensive caries examination, in which only real cavities are diagnosed, will tend to show higher values for the caries inhibition (HAYES, McCAULEY and ARNOLD, 1956).

REFERENCES

- HEALTH COUNCIL. 1960. Report of the Committee on fluoride of the Health Council, the Netherlands, June 1960. (Dutch text).
- BACKER DIRKS, O., VAN AMERONGEN, J. and WINKLER, K. C. 1951. A reproducible method for caries evaluation. *J. dent. Res.* **30**, 346-359.
- BACKER DIRKS, O. and KWANT, G. W. 1954. A reproducible method for caries evaluation—IV. *Tijdschr. Tandheelk.* **61**, 891-904.
- BACKER DIRKS, O., KWANT, G. W. and KLAASSEN, C. B. 1957. A reproducible method for caries evaluation—V. Pit and fissure caries of molars and prae-molars. *Tijdschr. Tandheelk.* **64**, 77-85.
- RUSSELL, A. L. and WHITE, C. L. 1959. Dental caries in Maryland children after 5 years of fluoridation. *Publ. Hlth Rep., Wash.* **74**, 289-295.
- HAYES, R. L., McCAULEY, H. B. and ARNOLD, F. A. 1956. Clinical and roentgenographic examinations for dental caries in Grand Rapids, Mich. *Publ. Hlth Rep., Wash.* **71**, 1228-1236.

NEUERE VERSUCHE ÜBER DEN KARIES-PROTEKTIVEN EFFEKT DES IM TRINKWASSER ENTHALTENEN MOLYBDÄNS

P. ADLER und I. PORCSALMY

Stomatologische Universitätsklinik und Med.-Chemisches
Universitätsinstitut, Debrecen, Ungarn

Zusammenfassung—Der karies-protektive Effekt eines 0,1 ppm Molybdänzusatzes zum Trinkwasser bei pH 6,0, 7,0 und 8,0 konnte in drei Tiergenerationen nachgewiesen werden.

Abstract—The caries-protective action of 0.1 p.p.m. molybdenum as a supplement to the drinking water of rats at pH 6.0, 7.0 and 8.0, respectively, was demonstrated in three generations of rats.

Résumé—L'effet protecteur contre la carie dentaire d'une adjonction de 0,1 % de molybdène à l'eau potable aux pH 6,0, 7,0 et 8,0 a pu être démontré sur trois générations d'animaux.

IN FORM einer kurzen Diskussionsbemerkung wurde von ADLER und STRAUB (1956) an der ORCA-Tagung in Marburg an Hand der Ergebnisse karies-epidemiologischer Untersuchungen in Ungarn die Vermutung ausgesprochen, dass in manchen Trinkwässern neben dem Fluorid andere karies-protektive Spurenelemente enthalten sind; eines derselben dürfte das Molybdän sein. 1957 konnte die Bestätigung dieser Vermutung an Hand von Rattenversuchen erbracht werden (ADLER, 1957): es wurde der karies-protektive Effekt kleinster im Trinkwasser enthaltenen Molybdänmengen bei der Ratte gezeigt. Unsere in Marburg gegebene Anregung aufgreifend hat MÜNCH (1957) Versuche mit Molybdän an Hamstern durchgeführt; nach seinem Bericht bewirken kleine Mo-Dosen (die allerdings viel höher als die von uns angewandten Mengen sind) eine eindeutige Kariesreduktion. Diese günstigen Erfahrungen wurden in der Zwischenzeit durch zwei weitere unabhängige Untersuchungsreihen bestätigt: einerseits durch KRUGER (1959) in Brisbane (dem unsere Untersuchungsergebnisse vor der Abfassung seines Berichtes unbekannt waren), andererseits durch LUTOMSKA und PAWLAK (1960) in Gdansk.

Uns schien es auch notwendig, die eindeutig positiven Ergebnisse der ersten Rattenversuche nachzuprüfen. Als Mo-Zusatz haben wir nämlich Natriummolybdänat verwendet, wodurch der pH-Wert des Getränkes der Versuchstiere eine Verschiebung zur alkalischen Seite erfuhr, ohne eine derartige Alkalisierung des Trinkwassers der Kontrollen durchgeführt zu haben. Die Nachprüfungen dienten in erster Linie der Klärung dieser Frage. Weiterhin wollten wir nachsehen, ob sich ein Schutzeffekt in langfristigen Versuchen nachweisen lässt.

METHODIK

Zu den Versuchen wurden juvenile Abkömmlinge von über mehrere Generationen von uns gezüchteten Ratten verwendet.—Es wurden vier, aus je 3 Männchen und 9 Weibchen bestehende Gruppen gebildet. Je ein Männchen und 3 Weibchen waren in einem gemeinsamen Käfig untergebracht. Eine Gruppe diente als Kontrolle (dest. Wasser), die anderen erhielten zum dest. Wasser Molybdänzustaz (als Natriummolybdänat, mit einem Mo-Gehalt von 0,1 mg je Liter im trinkfertigen Gemisch=0,1 ppm); die Trinkflüssigkeit wurde gruppenweise auf pH 6,0, 7,0 bzw. 8,0 eingestellt. Als kariogene Kost wurde die übliche Maisgriesdiät ad libitum gegeben. Die Versuchsdauer für diese Tiere (Parentalgeneration) betrug 185 Tage.

Neue Gruppen wurden von den Abkömmlingen der Parentalgeneration nach etwa 5½ Monaten gebildet (I. Filialgeneration). Die Jungtiere erhielten von der Entwöhnung an die gleiche Diät und das gleiche Trinkwasser wie die Eltern. Für Kontrollen und Mo-Zusatz bei pH 6,0 konnten Tiere in Vollzahl in den Versuch eingestellt werden (3 Männchen+9 Weibchen); mit Mo-Zusatz bei pH 7,0 nur 2 Käfige (8 Tiere), bei pH 8,0 nur 4 Tiere. Versuchsdauer von der Separation der Gruppen gerechnet: 350 Tage.

Abkömmlinge der ersten Filialgeneration dienten als Versuchstiere der dritten Serie (2. Filialgeneration). Alle Gruppen wurden mit der vollen Tierzahl eingestellt. Futter und Trinkwasser vom Entwöhnen an mit den Eltern identisch; Versuchsdauer (nach Separieren der Gruppen) 197 Tage.

Der kariogenen Kost und dem etwaigen Mo-Zusatz waren die Tiere der 1. und 2. Filialgeneration von der Entwöhnung an, also länger als die angeführte Versuchsdauer ausgesetzt.

Aus der Parentalgeneration haben wir 2 Tiere der pH 7,0 und je 1 Tier der pH 6,0 und 8,0 Gruppen verloren; aus der 1. Filialgeneration 2 Kontrollen und 2 Tiere aus der pH 7,0-Gruppe, 1 Tier der pH 8,0-Gruppe; aus der 2. Filialgeneration je 1 Tier der Kontroll- und pH 8,0-Gruppe, je 2 Tiere der pH 6,0 und 7,0-Gruppe. Die übrigen Tiere haben die lange Versuchsdauer gut überlebt.

Der Kariesbefall wurde nur an den Tieren gewertet, welche die jeweilige volle Versuchsdauer überlebt haben. Die Wertung erfolgte (1) nach der Zahl der kariesbefallenen Tiere, (2) der kariesbefallenen Molaren sowie (3) in Form von Caries-Scores nach der Beschreibung von KÖNIG, MARTHALER und MÜHLEMANN (1958). Da uns zum Schneiden der Zähne keine Spezialmaschine zur Verfügung steht, haben wir von den Molaren mit zahnärztlichen Diamantscheiben dünne Schichten abgetragen und die jeweiligen frischen Schliff-Flächen mit dem Schiff'schen Reagens zu färben versucht (Methodik s.bei KÖNIG *et al.*).

ERGEBNISSE

Die Daten über den Kariesbefall der einzelnen Gruppen sind aus Tabelle 1 zu sehen. Die statistische Wertung der Caries-Scores zeigt hinwiederum Tabelle 2*.

* Da infolge der eingetretenen Tierverluste die Geschlechtsverteilung in den einzelnen Gruppen nicht gleich geblieben ist, hielten wir es für angebracht, die Daten für Weibchen—die ja in grösserer Zahl unter den Versuchstieren vertreten sind—gesondert anzuführen. In Tabelle 1 erscheinen diese Zahlendaten in Klammern, in Tabelle 2 als gesonderter Abschnitt.

Nach den Zahldaten der beiden Tabellen scheint der gewählte Molybdänzusatz (0,1 ppm Mo) auch in dieser mehrfachen Versuchsserie eine deutliche Kariesreduktion bewirkt zu haben. Für alle Tiere gerechnet ist der Unterschied verglichen mit den Kontrollen in 8 der 9 Versuchsgruppen signifikant; in 6 Gruppen unter den Weibchen. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen fanden wir unter 9 Vergleichen im gesamten Tiergut nur in zwei Gruppen, unter den Weibchen nur in einer Gruppe einen signifikanten Unterschied.

TABELLE 1. DER KARIOBEFALL DER EINZELNEN TIERGRUPPEN

	Parental-generation	I. Filial-generation	II. Filial-generation
Kontrollen: destilliertes Wasser			
Zahl der Versuchstiere	12 (9)	10 (7)	11 (8)
Zahl d. Tiere mit Karies	9 (6)	9 (6)	11 (8)
Durchschn. Zahl d. kar. Molaren	1,67 (1,44)	2,80 (1,43)	3,82 (3,88)
Durchschnittl. Caries Score	4,50 (3,33)	6,60 (5,57)	11,09 (12,50)
0,1 ppm Molybdänzusatz, pH 6,0			
Zahl der Versuchstiere	11 (9)	12 (9)	10 (8)
Zahl d. Tiere mit Karies	2 (1)	8 (6)	8 (6)
Durchschn. Zahl d. kar. Molaren	0,17 (0,11)	1,08 (1,11)	2,20 (1,75)
Durchschnittl. Caries Score	0,17 (0,11)	2,50 (2,67)	7,20 (5,50)
0,1 ppm Molybdänzusatz, pH 7,0			
Zahl der Versuchstiere	10 (8)	6 (4)	10 (7)
Zahl d. Tiere mit Karies	3 (3)	3 (4)	4 (3)
Durchschn. Zahl der kar. Molaren	0,30 (0,25)	0,83 (1,00)	0,60 (0,71)
Durchschnittl. Caries Score	0,30 (0,25)	2,33 (3,25)	1,90 (2,29)
0,1 ppm Molybdänzusatz, pH 8,0			
Zahl der Versuchstiere	11 (8)	3 (2)	11 (8)
Zahl d. Tiere mit Karies	5 (4)	0 (0)	8 (5)
Durchschn. Zahl d. kar. Molaren	0,45 (0,50)	0 (0)	1,36 (1,25)
Durchschnittl. Caries Score	0,64 (0,75)	0 (0)	2,55 (2,63)

Ohne Klammer: alle Tiere; in Klammern: nur Weibchen.

Infolge der geringen Zahl der Versuchstiere in der pH 7,0- und 8,0-Molybdängruppe der I. Filialgeneration, sind die sich auf diese zwei Gruppen beziehenden Zahldaten und Vergleiche mit der grössten Zurückhaltung zu betrachten.

TABELLE 2. DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DER UNTERSCHIEDE DER CARIES-SCORES

Gruppe	Parentalgeneration		I. Filialgeneration		II. Filialgeneration	
	Score	Unterschied	Score	Unterschied	Score	Unterschied
I. Alle Tiere						
Kontrolle	(a) $4,50 \pm 1,36$	(a,b) $4,33 \pm 1,36$; (a,c) $4,20 \pm 1,36$;	(a) $6,60 \pm 1,39$	(a,b) $4,10 \pm 1,44$ † (a,c) $4,27 \pm 2,10$ *	(a) $11,09 \pm 1,72$	(a,b) $3,89 \pm 2,58$ (a,c) $9,19 \pm 1,92$ ‡
Mo, pH 6,0	(b) $0,17 \pm 0,12$	(a,d) $3,86 \pm 1,39$ † (b,c) $-0,13 \pm 0,20$	(b) $2,50 \pm 0,70$	(a,d) $6,60 \pm 1,39$ ‡ (b,c) $0,17 \pm 1,75$	(b) $7,20 \pm 1,93$	(a,d) $8,54 \pm 1,86$ ‡ (b,c) $5,30 \pm 2,11$ †
Mo, pH 7,0	(c) $0,30 \pm 0,15$	(b,d) $-0,47 \pm 0,30$	(c) $2,33 \pm 1,60$	(b,d) $2,50 \pm 0,70$	(c) $1,90 \pm 0,86$	(b,d) $4,65 \pm 2,05$ *
Mo, pH 8,0	(d) $0,64 \pm 0,28$	(c,d) $-0,34 \pm 0,31$	(d) 0	(c,d) $2,33 \pm 1,60$	(d) $2,55 \pm 0,70$	(c,d) $-0,65 \pm 0,35$
II. Nur Weibchen						
Kontrolle	(a) $3,33 \pm 1,29$	(a,b) $3,22 \pm 1,30$ * (a,c) $3,08 \pm 1,30$ *	(a) $5,57 \pm 1,86$	(a,b) $2,90 \pm 2,04$ (a,c) $2,32 \pm 3,01$	(a) $12,50 \pm 2,06$	(a,b) $7,00 \pm 2,85$ * (a,c) $10,21 \pm 2,37$ ‡
Mo, pH 6,0	(b) $0,11 \pm 0,11$	(a,d) $2,58 \pm 1,34$ (b,c) $-0,14 \pm 0,20$	(b) $2,67 \pm 0,83$	(a,d) $5,57 \pm 1,86$ † (b,c) $-0,58 \pm 2,50$	(b) $5,50 \pm 1,96$	(a,d) $9,87 \pm 2,27$ ‡ (b,c) $3,21 \pm 2,28$
Mo, pH 7,0	(c) $0,25 \pm 0,16$	(b,d) $-0,64 \pm 0,38$	(c) $3,25 \pm 2,46$	(b,d) $2,67 \pm 0,83$ ‡ (c,d) $3,25 \pm 2,36$	(c) $2,29 \pm 1,17$	(b,d) $2,87 \pm 2,19$
Mo, pH 8,0	(d) $0,75 \pm 0,37$	(c,d) $-0,50 \pm 0,40$	(d) 0	(c,d) $2,67 \pm 0,83$ ‡ (c,d) $3,25 \pm 2,36$	(d) $2,63 \pm 0,96$	(c,d) $-0,34 \pm 1,51$

* Der Unterschied erreicht zumindest den zweifachen Wert seines mittleren Fehlers.

† Der Unterschied erreicht zumindest den zweieinhalbfachen Wert seines mittleren Fehlers.

‡ Der Unterschied erreicht zumindest den dreifachen Wert seines mittleren Fehlers.

BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Auffallend ist der Unterschied im Kariesbefall zwischen den drei Versuchsserien. Infolge der Einstellung der Parentalgeneration auf die Kariesdiät im juvenilen, aber immerhin späteren Alter als der beiden Filialgenerationen, welche die Kariesdiät von der Entwöhnung an genossen haben, war der Kariesbefall der Letzterwähnten wesentlich stärker als der Befall der Parentalgeneration. Dies gilt für Kontrollen und Molybdän-Tiere, für das gesamte Tiergut wie für die Weibchen gesondert. Trotz Einstellung auf die Kariesdiät auf gleiche Weise bei der Entwöhnung, war der Kariesbefall der 2. Filialgeneration deutlich stärker als der 1. Auf die hiermit verknüpften Probleme können wir an Hand unseres kleinen Versuchsmaterials näher nicht eingehen.

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint neben dem Molybdänzusatz auch der pH-Wert des Getränkes einen Einfluss auf den Kariesbefall zu haben. Bei gleichem Molybdänzusatz war der Kariesbefall in der am stärksten befallenen 2. Filialgeneration bei pH 7,0 und 8,0 wesentlich geringer als bei pH 6,0. Für alle Tiere gerechnet ergaben sich diesfalls statistisch signifikante Unterschiede zwischen den pH 7,0 und 8,0 Gruppen auf der einen, und der pH 6,0 Gruppe auf der anderen Seite; bei den Weibchen waren gleichsinnige, aber statistisch nicht mehr signifikante Unterschiede zu sehen. Infolge des ausserordentlich geringen Kariesbefalles der Parentalgeneration und der geringen Tierzahl der pH 7,0 und 8,0 Gruppen in der 1. Filialgeneration kann weder dem fehlenden, noch dem sich als statistisch-signifikant erwiesenen Unterschied zwischen einzelnen Molybdängruppen eine praktische Bedeutung beigemessen werden. Allenfalls zeigen aber unsere Versuche, dass der Mo-Schutzeffekt nicht der Alkalisierung des Getränkes der Versuchstiere zuzuschreiben ist.

Zwei Bemerkungen allgemeiner Art scheinen uns noch notwendig. Die Caries-Scores kamen auch in den langfristigen Versuchen grösstenteils durch A-Läsionen zustande; wesentlich geringer ist die Zahl der B- und C-Läsionen. Eine wirklich tiefe Zerstörung von Molaren, wie sie vielfach abgebildet ist, haben wir weder bei Kontrollen, noch bei Versuchstieren gesehen.

Weiterhin fielen die starken individuellen Unterschiede im Kauflächenverschleiss und im Kariesbefall zwischen den Tieren der gleichen Gruppe und des gleichen Käfigs auf. Dies mag z.T. auf die genetische Uneinheitlichkeit unserer Versuchstiere zurückgeführt werden. Allenfalls bietet aber die menschliche Karies auch die gleichartige Erscheinung starker individueller Schwankungen trotz eventueller Gleichheit der Umweltbedingungen. Mit Rücksicht darauf muss mit Recht gefordert werden, Schlüsse nur aus grossen Versuchsgruppen—gleichgültig, ob es sich um menschliche Probanden oder um Tierversuche handelt—zu ziehen.*

Zusammen mit unseren in Malmö berichteten Versuchen haben wir Erfahrungen über 172 Versuchs- und 82 Kontrolltiere, wobei der Schutzeffekt des Molybdäns in

* Welche Vorsicht bei der Wertung der Befunde kleiner Tiergruppen erforderlich ist, geht auch aus den Unterschieden der statistischen Signifikanz der in unseren Versuchsgruppen nachweisbaren Differenzen hervor, je nachdem ob wir das gesamte Tiermaterial oder nur die Weibchen gewertet haben!

allen Einzelversuchen deutlich und in den meisten Gruppen statistisch signifikant war. Im Vergleich zu den in menschlichen karies-epidemiologischen Untersuchungen geforderten Beobachtungszahlen sind diese Tierzahlen sehr gering. Da drei weitere Untersucher, z.T. ohne Kenntnis unserer positiven Befunde, gleichfalls einen Karies-Schutzeffekt nachgewiesen haben, dürfte ein Schluss auf die karies protektive Wirkung kleiner Molybdändosen im Trinkwasser—trotz aller Zurückhaltung—berechtigt sein.

LITERATUR

- ADLER, P. 1957. Experiments with albino rats upon the caries-protective effect of water-borne molybdenum. Proc. 4th Congr. of ORCA, Malmö (*Odont. Revy*), pp. 48–53.
- ADLER, P. und STRAUB, J. 1957. Diskussionsbemerkung zum Vortrag M. Winiker's. 3. Tagung ORCA, Marburg, 1956. *Z. prophylakt. Med.* **1**, 8.
- KÖNIG, K. G., MARTHALER, TH. M. und MÜHLEMANN, H. R. 1958. Methodik der kurzfristig erzeugten Rattenkaries. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.* **29**, 99–127.
- KRUGER, B. J. 1959. The effect of trace elements on experimental dental caries in the albino rat—I. A study of boron, copper, fluorine, manganese and molybdenum. Univ. Queensland Papers, Dept. of Dentistry, **1**, No. 1.
- LUTOMSKA, K. und PAWLAK, J. 1960. L'action combinée de quelques oligo-éléments sur la carie dentaire expérimentale chez les animaux. *Schweiz. Mschr. Zahnheilk.* **70**, 44–52.
- MÜNCH, J. 1957. Die Beziehungen des Spurenelements Molybdän zur Zahnkaries. Verh. 4. Tagg. ORCA, Malmö (*Odont. Revy*), pp. 54–67.

ORGANISIERUNG, DURCHFÜHRUNG UND ERFAHRUNGEN DER TRINKWASSERFLUORIDIERUNG IN KARL-MARX-STADT—I BERICHT

H. LINGELBACH

Karl-Marx-Stadt, Deutschland

Zusammenfassung—Die Fluoridierung des Trinkwassers von Karl-Marx-Stadt wurde durch ein Team ins Leben gerufen, das aus zwei Zahnärzten, zwei Ärzten, zwei Ingenieuren, einem Chemiker und einem Biologen besteht. Seit dem 12. Oktober 1959 wird die gesamte Stadt mit einer Einwohnerzahl von 300 000 mit fluoridiertem Trinkwasser versorgt. In der Zeit von März bis Oktober 1959 wurden ca. 30 000 Kinder untersucht, um den Stand der Caries zu erfassen.

Die Kosten für den Bau der Fluoridierungsanlage betrugen 120 000.-DM, während die Kosten für die laufende Trinkwasserfluoridierung, berechnet pro Kopf und Jahr der Bevölkerung bei einem täglichen Wasserverbrauch von 220 Litern pro Einwohner, 0,10 DM ausmachen. Für die Trinkwasserfluoridierung wird Natrium-silicofluorid verwendet, um den Fluorgehalt des Wassers von 0,2 mg/l auf 1,0 mg/l zu erhöhen. Die Fluoridierung des Wassers erfolgt vor der Filterung, was keinen Einfluss auf den Fluorgehalt des Trinkwassers hat. Für die Fluoridierung wird normalerweise eine 0,5 prozentige Natriumsilicofluorid-Lösung verwendet. Im Winter, wenn das Talsperrenwasser Temperaturen bis zu 2,5°C aufweist, muss der Prozentgehalt der Lösung auf 0,4 gesenkt werden.

Die Trinkwasserfluoridierung wird täglich durch chemische Untersuchungen von Seiten des Bezirks-Hygiene-Institutes und des städtischen Wasserwerks kontrolliert. In Verbindung mit der Fluoridierung werden vom Forschungslaboratorium des Bezirks-Hygiene-Institutes-Karl-Marx-Stadt Lebensmittel untersucht, um den Einfluss des Fluors im Trinkwasser festzustellen.

In vier Jahren soll der Erfolg der Trinkwasserfluoridierung in Karl-Marx-Stadt durch die Untersuchung der gleichen Anzahl von Kindern, wie zu Beginn dieser Massnahme, ermittelt werden.

Abstract—The fluoridation of drinking water of Karl-Marx-Stadt has been organized by a team consisting of two dental surgeons, two physicians, two engineers, a chemist and a biologist. Since 12 October 1959, 300,000 inhabitants, the whole population of the city, have been supplied with fluoridated water. From March to October 1959 about 30,000 children were examined, in order to ascertain the caries incidence.

The fluoridation plant has cost 120,000 DM and the costs per head and year at a daily water consumption of 220 litres per person are 0.10 DM. For the water-fluoridation, sodium silicofluoride is used and the concentration of fluorine is brought from 0.2 to 1.0 p.p.m. The water is fluoridated before filtering, which does not alter the concentration of fluorine in the drinking-water. A 0.5% solution of sodium silicofluoride is usually taken for the fluoridation. In winter, when river-dam-water reaches low temperatures down to 2.5°C, the percentage in the solution has to be reduced to 0.4. The fluoridation of drinking-water is controlled daily by chemical analysis performed at the Institute of Hygiene of Karl-Marx-Stadt and the municipal water works. In connexion with the fluoridation, a research laboratory of the Institute of Hygiene of Karl-Marx-Stadt is testing different foods in order to determine the influence of the fluorine concentration in drinking-water.

In 4 years time, the success of the fluoridation of the drinking-water of Karl-Marx-Stadt will be determined by examining again the same number of children as at the beginning of the fluoridation.

Résumé—La fluoration de l'eau potable de Karl-Marx-Stadt a été organisée par une équipe composée de deux dentistes, deux médecins, deux ingénieurs, un chimiste et un biologiste. Depuis le 12 Octobre 1959, la ville entière comprenant une population de 300 000 habitants, est pourvue d'eau potable fluorée. Pendant la période s'étendant du mois de mars jusqu'au mois d'octobre 1959, environ 30 000 enfants ont été examinés pour obtenir une idée de la fréquence de la carie dentaire.

La dépense pour la construction de l'installation de fluoration s'est montée à DM 120 000, tandis que la dépense pour la fluoration courante de l'eau potable, calculée par tête de la population et par an, s'élève à DM 0,10, pour une consommation journalière d'eau de 220 litres par habitant. Pour la fluoration de l'eau potable du silico-fluorure sodique est utilisé pour augmenter le contenu en fluor de l'eau de 0,2 mg/l à 1,0 mg/l. La fluoration de l'eau est effectuée avant la filtration, ce qui n'a pas d'influence sur le taux de fluor de l'eau potable. Pour la fluoration on emploie normalement une solution de 0,5% de silico-fluorure sodique. En hiver, si l'eau des barrages descend à des températures voisines de 25°C, le pourcentage de la solution doit être abaissé à 0,4%.

La fluoration de l'eau potable est contrôlée chaque jour par des analyses chimiques effectuées par l'Institut Régional d'Hygiène et par le Service Municipal de Distribution des Eaux.

En combinaison avec la fluoration, des aliments sont examinés par le Laboratoire de Recherches de l'Institut Régional d'Hygiène de Karl-Marx-Stadt pour évaluer l'influence du fluor de l'eau potable.

Après quatre ans, le résultat de la fluoration de l'eau potable, à Karl-Marx-Stadt, sera déterminé par l'examen d'un nombre d'enfants identique à celui utilisé au début de cette étude.

ORGANISIERUNG

DER WEG, der bis zur Fluoridierung des Trinkwassers in Karl-Marx-Stadt führte, wurde nicht administrativ beschritten. Die in einigen europäischen Städten begonnene versuchsweise Einführung der Trinkwasserfluoridierung gab in Karl-Marx-Stadt die Anregung zu einem Zusammenschluss von Fachleuten verschiedener Richtungen zu einer Arbeitsgemeinschaft, die sich die Aufgabe stellte, die Möglichkeiten einer Cariesprophylaxe mittels Fluor für Karl-Marx-Stadt zu prüfen. So bildete sich im Dezember 1955 auf der Basis der freiwilligen Zusammenarbeit ein Arbeitskreis, dem heute 2 Zahnärzte, 2 Ärzte, 2 Ingenieure, 1 Biologe und 1 Chemiker angehören. Als prophylaktische Massnahme gegen die Caries wurde neben der Erwägung einer Trinkwasserfluoridierung, auch die Fluoridierung der Milch in den engeren Kreis der Betrachtung gezogen. Die Tatsache, dass Karl-Marx-Stadt eine zentrale Wasserversorgung besitzt, gab schliesslich den Ausschlag, diesen vorteilhaften Umstand zu nutzen und die Einführung einer Trinkwasserfluoridierung zu prüfen. Im Januar 1957 wurde von der Arbeitsgemeinschaft dem Gesundheitsministerium der DDR ein Exposé überreicht, das Vorschläge für die technische Durchführung der Trinkwasserfluoridierung, für die chemische Überwachung, Kontrollrichtlinien der Hygiene und Hinweise für die zahnärztlichen Belange einer derartigen Massnahme enthielt. Noch im gleichen Jahre genehmigte das Gesundheitsministerium die Einführung der Trinkwasserfluoridierung in Karl-Marx-Stadt und 1958 beschloss der Rat der Stadt Karl-Marx-Stadt die Durchführung dieser Massnahme. In der Zwischenzeit wurde

die Bevölkerung von Karl-Marx-Stadt durch Rundfunk, Presse und Vorträge über den Sinn und Zweck der Trinkwasserfluoridierung aufgeklärt, wobei eine grosse Aufgeschlossenheit und rege Anteilnahme festgestellt werden konnte.

DURCHFÜHRUNG

Am 12. Oktober 1959 wurde in feierlicher Form, in Anwesenheit von in- und ausländischen Gästen die Karl-Marx-Städter Fluoridierungsanlage durch den Präsidenten der ORCA, Herrn Dr. BACKER DIRKS, in Betrieb genommen. Seit diesem Tage wird die etwa 300 000 Einwohner zählende Stadt mit fluoridiertem Trinkwasser versorgt.

Man kann wohl mit Recht die cariesprophylaktische Massnahme in Karl-Marx-Stadt bis jetzt als die grösste ihrer Art auf dem Gebiet der Stomatologie in Europa bezeichnen, wenn man mit in Betracht zieht, dass von März 1959 bis zum Beginn der Trinkwasserfluoridierung mit Hilfe von 25 Zahnärzten und durch Unterstützung der Abteilung Kariesforschung und -therapie der Klinik und Poliklinik für Zahn-Mund- und Kieferkrankheiten der Humboldt-Universität zu Berlin, nahezu 30 000 Kinder verschiedener Altersklassen untersucht wurden, um den Stand der Caries zu erfassen. In der benachbarten Stadt Plauen, die als Vergleichsstadt für die Auswertung der Trinkwasserfluoridierung in Karl-Marx-Stadt herangezogen wurde, sind zur gleichen Zeit zahnärztliche Untersuchungen zur Erfassung der Caries an einem entsprechend grossen Kreis von Kindern vorgenommen worden.

Der für die technische Durchführung der Fluoridierung notwendige Bau einer entsprechenden Anlage wurde von Mitgliedern der Arbeitsgemeinschaft projektiert. Die Kosten der Fluoridierungsanlage betrugen 120 000 DM und wurden von der Stadt getragen.

Die Fluoridierungsanlage ist ausser der Dosierungsmaschine doppelt erstellt worden und besteht aus 2 Vorratsbunkern zur Speicherung von Natriumsilikofluorid, 2 Lösebehältern mit einem Gesamtinhalt von 20 m³, in denen eine 0,5 bzw. 0,4 prozentige Na₂SiF₆-Lösung hergestellt wird, 2 Dosierungsbehältern zur Aufnahme dieser Lösung, die ebenfalls einen Gesamtinhalt von 20 m³ aufweisen, 2 Waagen und einer Dosierungsmaschine der Firma Bran und Lübbe, Hamburg.

Karl-Marx-Stadt besitzt für die zentrale Wasserversorgung ausschliesslich Talsperrenwasser, das im Durchschnitt einen F'-Gehalt von 0,2 mg/l aufweist. Durch die Dosierungsmaschine wird in Abhängigkeit von der Wassermenge, die an die Stadt abgegeben wird, vor der Filtration des Wassers soviel Fluor zugesetzt, dass der Fluorgehalt des Trinkwassers 1,0 mg/l beträgt.

Für die Fluoridierung wird eine technisch reine Chemikalie mit einem Na₂SiF₆ Gehalt von 95% verwendet, die in der DDR in reichlichem Masse äusserst preisgünstig zur Verfügung steht. Die täglich benötigte Natriumsilikofluorid-Menge beträgt bei einem Spitzenverbrauch von 80 000 m³/d 106 kg. Diese Tagesmenge liegt in 21,2 m³ als 0,5 prozentige Na₂SiF₆-Lösung vor. Bei einem Wasserverbrauch von 80 000 m³/d muss die Dosierungsmaschine stündlich 880 l 0,5 prozentige Fluordosierungslösung an das Trinkwasser abgeben, um den F'-Gehalt von 0,2 auf 1,0 mg/l zu erhöhen. Die maximale Abgabeleistung der Karl-Marx-Städter Dosierungsmaschine beträgt 1380 l/h.

Die Fluoridierungsanlage, die in das Gebäude der Filteranlage mit eingebaut wurde, arbeitet fast vollautomatisch, sodass das Personal der Filteranlage die Fluoridierungsanlage mit bedienen kann. Dadurch werden keine zusätzlichen Arbeitskräfte benötigt.

Die Kosten der Fluoridierung sind in Karl-Marx-Stadt äusserst niedrig und liegen bei 0,10 DM pro Kopf und Jahr der Bevölkerung bei einem täglichen Wasserverbrauch von 220 l/Kopf, einschliesslich dem Industriewasserverbrauch.

Die Trinkwasserfluoridierung erfordert schnelle und sichere chemische Kontrolluntersuchungen. In Karl-Marx-Stadt wird hierfür die Eriochromcyanin-Methode nach Megregian und Mulder verwendet, entsprechend den Analysenvorschriften des Teams III der ORCA. Unabhängig voneinander prüfen das Bezirks-Hygiene-Institut und das Wasserwerk täglich von mehreren Stellen der Stadt den Fluoridgehalt des Trinkwassers, wobei die Dosierungsschwankungen nicht mehr als $\pm 5\%$ betragen sollen.

ERFAHRUNGEN

Das Sammeln von Erfahrungen auf dem Gebiet der Trinkwasserfluoridierung umfasst neben der zahnärztlichen, auch die chemische und technische Seite. Mit dem Beginn einer Trinkwasserfluoridierung treten zuerst die chemisch-technischen Belange, in Form von nicht vorherzusehenden Schwierigkeiten, in den Vordergrund. So dauerte es einige Wochen, bis durch eine veränderte Wasserumwälzung in den Lösebehältern eine 0,5 prozentige Na_2SiF_6 -Lösung und somit ein F'-Gehalt von 1,0 mg/l im Wasser erreicht wurde. Etwa zur gleichen Zeit musste festgestellt werden, dass die an und für sich nicht hygroskopische Chemikalie in den Vorratsbunkern zur Brückenbildung neigt und somit das Abfüllen in die Lösebehälter sehr erschwert. Durch entsprechende technische Veränderungen soll diese unangenehme Erscheinung beseitigt werden.

Bei der Verwendung einer 0,5 prozentigen Na_2SiF_6 -Lösung wurde davon ausgegangen, dass die theoretische Löslichkeit von Natriumsilikofluorid bei 17°C 0,65 % beträgt, das Talsperrenwasser aber teilweise weit niedrigere Temperaturen aufweist. Als die Wassertemperatur im Winter unter 5°C absank und schliesslich nur noch 2°C betrug, war es nicht mehr möglich, mit einer 0,5 prozentigen Lösung zu arbeiten, da grössere Mengen der Chemikalie sich nicht mehr lösten und sich am Boden des Lösungsbehälters absetzten. Während des Absinkens der Temperatur wurden in den Löse- und Dosierungsbehältern teilweise Konzentrationsschichtungen festgestellt, obwohl die Temperatur in den Schichtungsbereichen nur um einige zehntel Grad differierte. Dadurch kam es zeitweilig zu Unterdosierungen. Durch Laborversuche konnte ermittelt werden, dass eine 0,4 prozentige Na_2SiF_6 -Lösung bis zu einer Wassertemperatur von 2,5°C als Dosierungslösung verwendet werden kann. Mit dieser Lösung wurde bei sehr niedrigen Wassertemperaturen ohne weiteres ein Fluorgehalt von 1,0 mg/l im städtischen Wasserleitungsnetz erreicht.

Natriumsilikofluorid ruft noch als 0,4 prozentige Lösung, wenn diese sich in Bewegung befindet, äusserst starke Korrosionserscheinungen bei Eisen hervor, auch wenn dieses durch einen Anstrich geschützt ist. Die Lösung dringt mit der Zeit

unter die Farbe, hebt sie ab und bringt das Eisen völlig zur Auflösung. Aus diesem Grunde dürfen keine Eisenteile, auch wenn sie durch Farbe geschützt sind, mit einer fließenden Na_2SiF_6 -Lösung in Berührung kommen.

Durch die Fluoridierung des Wassers vor den Kiesschnellfiltern trat bisher in Karl-Marx-Stadt noch keine Fluorzehrung auf. Inwieweit durch das stark verrostete Wasserleitungsnetz eine Fluorzehrung in Erscheinung treten kann, wird noch untersucht.

In Karl-Marx-Stadt wird z.Z. vom Bezirks-Hygiene-Institut ein Fluorlaboratorium eingerichtet, in dem lebensmittelchemische, klinisch-chemische und chemisch-technische Untersuchungen in Zusammenhang mit der Trinkwasserfluoridierung durchgeführt werden sollen. Gleichfalls haben Chefärzte der verschiedenen klinischen Einrichtungen der Stadt ihre Mitarbeit bei der Durchführung spezieller Beobachtungen, die sich von der Einführung der Trinkwasserfluoridierung ableiten, zugesagt. Es ist vorgesehen, nach einer Fluoridierungszeit von 4 Jahren, die ersten zahnärztlichen Auswertungen dieser Massnahme vorzunehmen. Sämtliche Erfahrungen der Trinkwasserfluoridierung in Karl-Marx-Stadt werden von der örtlichen "Arbeitsgemeinschaft für Cariesprophylaxe und Trinkwasserfluoridierung" zusammengefasst und ausgewertet.

TRINKWASSERANALYSEN UND KARIES IM KALIBERGBAUGEBIET WESTTHÜRINGENS

G. HENKEL

Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland

Zusammenfassung—In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Teilen Thüringens die Fluorwerte in Trinkwässern über längere Zeit festgestellt. Neuere Untersuchungen fanden in Westthüringen statt. In diesem Gebiet befinden sich Kaliwerke. Die Endlaugen der Kaliproduktion werden in das Gestein gepresst. Es kommt zu einer Verseuchung des Trinkwassers durch die Endlaugen. Das Fluoraufkommen in diesem Gebiet beträgt im Jahresdurchschnitt 0,37 mg/l, in einem benachbarten Bezirk 0,43 mg/l. Es wurden Jugendliche im Alter von 12 bis 16 Jahren hinsichtlich der Karies untersucht. Die Zahl der DMF-Flächen scheint im Kaligebiet höher zu sein als im Kontrollgebiet. Beide Gebiete liegen jedoch insgesamt im Kariesbefall bedeutend höher als die anderen Orte Thüringens. Die meteorologischen Beobachtungen bestätigen die Abhängigkeit des Fluorgehaltes des Trinkwassers von der Jahreszeit. Die Verseuchung des Trinkwassers durch die Endlaugen ist nicht von meteorologischen Verhältnissen abhängig. Sie steht im Zusammenhang mit der Kaliproduktion. Nach den bisherigen Auswertungen ist zu vermuten, dass ein Einfluss hinsichtlich der Karies im ungünstigen Sinne besteht.

Abstract—Fluoride concentrations, contained in the drinking water of several parts of Thuringia, were evaluated during several years. Investigations were recently carried out in the western part of Thuringia, where potash factories are located. The final lyes, pressed into the stones, are contaminating the drinking water. In the abovementioned district, fluoride concentration increases to an annual average of 0.37 mg/l, whereas in the neighbouring district this value is 0.43 mg/l. Investigations of young people's teeth, from 12 to 16 years of age, were performed with regard to caries. The number of D.M.F. surfaces seems to be higher in the potash than in the control district. In both of these districts, however, a higher degree of caries was noted than in the other places of Thuringia. The meteorological observations confirm that the fluoride content of the drinking water is related to the seasons. But the contamination of the drinking water by the final lye, which is not dependent on meteorological conditions, is connected with the production of potash. According to our results, we presume that there is a negative and unfavourable influence with regard to caries.

Résumé—La concentration en fluor de l'eau potable de différentes régions de Thuringue a été déterminée pendant plusieurs années. Des analyses plus récentes ont été effectuées en Thuringue de l'Ouest, où se trouvent des usines de potasse. Ce sont les produits de dégradation de la potasse, pressés dans la pierre, qui contaminent l'eau potable. La concentration de fluor est en moyenne annuelle de 0,37 mg/l, alors que dans une région voisine elle est de 0,43 mg/l. Des investigations de la dentition de jeunes gens, âgés de 12 à 16 ans, ont été entreprises, pour détecter l'incidence de la carie dentaire. Le nombre de dents cariées, manquantes et obturées (D.M.F.) semble plus élevé dans le district riche en potasse que dans la région servant de contrôle. Pourtant un nombre plus élevé de caries a été observé dans ces deux endroits si on les compare à d'autres régions de Thuringue. Des observations météorologiques montrent que le contenu en fluor de l'eau potable est variable au cours des saisons. Mais la contamination industrielle de l'eau potable est due à la production de potasse et n'est pas liée à un facteur saisonnier. D'après nos résultats, il semble que cette situation est défavorable en ce qui concerne la carie dentaire.

DIE SENKE zwischen dem Südhang des Thüringer Waldes und dem Nordhang des Rhöngebirges ist sowohl geologisch als auch wirtschaftlich ein sehr wichtiges Gebiet. Die Hänge beider Gebirgszüge werden durch die Werra und ihre Nebenarme entwässert. Die breitere Flussaue wird zum Teil etwa ab Bad Salzungen vom Buntsandstein und weiter zum Thüringer Wald zu vom Plattendolomit des oberen Zechsteins eingesäumt. Die grosse wirtschaftliche Bedeutung ist durch den Kalibergbau gegeben. Bekannt sind die Werke Kaiseroda, Merkers, Heiligenroda und Unterbreizbach. Die sich unter dem Werratal entlang ziehenden mächtigen Kalilager reichen auf westdeutscher Seite bis Philippstal und Wintershall. Mit den Salzlagern zusammenhängend treten Quellen auf, die wie in Bad Salzungen zu Heilzwecken nutzbar gemacht worden sind.

In diesen Gebieten finden wir nun Störungen durch Veränderungen im Mineralgehalt des Wassers, die sich sowohl auf die Landschaft als auch auf technische Einrichtungen beziehen. Seit einigen Jahren glauben verschiedene alteingesessene Zahnärzte, auch eine erhöhte Kariesanfälligkeit bei Jugendlichen feststellen zu können, ohne allerdings bisher sichere Unterlagen für diese Annahme beigebracht zu haben. Die wiederholten Klagen und Hinweise veranlassten dazu, eingehendere Untersuchungen sowohl des Trinkwassers als auch der Karieshäufigkeit in diesen Gebieten vorzunehmen.

Mit Beginn der Trinkwasseruntersuchungen ergab sich bereits, dass allgemein im Gebiet von Vacha bis Bad Salzungen über eine Veränderung des Grundwasserspiegels und eine Erhöhung der Chlorionen im Trinkwasser geklagt wird. Die Berichte und Angaben entstammen sowohl den Wasserämtern als auch den Kontrollstellen des Kaliwerkes Merkers. Aus diesem Grunde wurden von 1957, teilweise von 1958 an bis Ende des Jahres 1959 in den Orten Vacha, Dorndorf, Merkers und Bad Salzungen an 8 Stellen wöchentlich zweimal Trinkwasserproben entnommen und diese analysiert.

In diesen Gebieten des Kalibergbaues treten seit Jahren Schwierigkeiten auf, da die Restlaugen aus der Kaligewinnung, vor allem das Magnesiumchlorid, nicht weiter aufgeschlossen werden können und als Abwässer der Werra oder dem Boden wieder zugeführt werden. Vor Jahrzehnten waren die Mengen der salzreichen Abwässer noch tragbar. Der Gesamtchloridgehalt der Weser bei Bremen betrug noch 1923 350 mg/l. Immerhin musste, wie DEUBEL (1954) berichtet, die Stadt Bremen schon damals zusätzlich aus Trinkwassertalsperren im Westharz versorgt werden, da das Grundwasser in der Weseraue Salz zu führen begann. Im Laufe der Jahre ist die Erzeugung von Kalisalzen zu Düngezwecken aber so erheblich gestiegen, dass nach einem Ausweg gesucht werden musste, der ermöglichte, die Restlaugen anderweitig unterzubringen. Es wurde daher zunächst der Versuch unternommen, diese Endlauge in den in diesen Gebieten bis etwa 25 m Mächtigkeit lagernden Dolomit zu versenken. Die zahlreichen Klüfte und Spalten im Gestein wie auch das lockere Gefüge, zumindest in den oberen Schichten, waren einem solchen Unternehmen förderlich. Mit mehreren Atmosphären Überdruck wird jetzt die spezifisch schwere Endlauge, die vor allem Chloride enthält, in die Gesteinsschichten gepresst. Da das Aufkommen an diesen Abwässern jährlich erheblich zunimmt, sind nun bereits weit über 200

Millionen cbm Endlauge in die Gesteinsschichten eingelagert worden. Da die Dolomitschichten nach Süden und Südwesten einfallen, bestand die Hoffnung, dass die Wasser in dieser Richtung abfließen würden. Umfangreiche Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass diese Hoffnung trügerisch war. Im Werrabecken zwischen Vacha und Bad Salzungen befinden sich zahlreiche eingemuldete Gebiete, die durch frühere Auslaugung des Zechsteinsalzes entstanden sind und in denen sich die Endlaugen sammeln. Es zeigt sich weiterhin, dass die über dem Plattendolomit liegenden Letten an mehreren Stellen Spalten oder Risse aufweisen, so dass die eingepresste Lauge weiter nach oben in den Buntsandstein eindringt. Auf diese Art wird das spezifisch leichtere Süßwasser zur Oberfläche gedrängt. Es nimmt weiterhin durch Austausch Cl-Ionen auf. In den letzten Jahren ist der Grundwasserspiegel nun so stark angestiegen, dass schon bei mittleren Regenfällen in einigen Einsenkungen die Keller der Wohnhäuser unter Wasser stehen und Trinkwasserbrunnen mehrere 100 mg Cl/l. aufweisen. Die Abwasserfrage ist damit, wie einschlägige Berichte, besonders aber der von DEUBEL aufzeigen, zu einer der schwierigsten für den Kalibergbau dieses Gebietes geworden.

Es liegt der Gedanke nahe, dass die Anreicherung des Trinkwassers durch die unwillkommenen Cl-Ionen Einfluss auf den Mineralstoffwechsel der Menschen und damit die Beständigkeit des Zahnhartgewebes hat. Es bestand daher die dringliche Aufgabe, in diesem Kalibergbaugebiet die Trinkwasserverhältnisse und die Kariesanfälligkeit bei Jugendlichen zu überprüfen. Während einerseits die Gesamtanalyse der Trinkwässer zum Teil von 1957 ab durchgeführt wurde, fanden andererseits Untersuchungen sämtlicher Schulkinder dieser Gebiete und weiterhin auch meteorologische Beobachtungen statt. Im Vergleich hierzu wurde eine Anzahl Rhöndörfer herangezogen, deren Trinkwässer nicht durch den Kalibergbau gestört sind, deren Mineralgehalt durch das Buntsandsteinvorkommen aber im allgemeinen gering ist.

Obwohl die Jugendlichen jeden Alters untersucht wurden, sind für die vorliegenden Betrachtungen besonders die 12-bis 16-Jährigen herausgesucht worden. Dauernd ortsansässige Kinder und zugezogene Kinder wurden getrennt. Sowohl das Werragebiet als auch das Rhöngebiet sind hinsichtlich der Fluorführung der Trinkwässer gut vergleichbar. Beide Gebiete zeigen über längere Beobachtungsabschnitte hinweg ein annähernd gleiches Fluoraufkommen.

Das Fluoraufkommen im Werragebiet liegt im Jahresdurchschnitt bei 0,37 mg Fluor/l. Die Erfassung der Quellen und Brunnen in den Rhöndörfern ergibt ein Fluoraufkommen von 0,43 mg/l. Die einzelnen Brunnen, Quellen oder Wasserleitungen im Werragebiet haben folgenden Jahresdurchschnitt an Fluor (1957-1959)

Bad Salzungen	0,40
Merkers	0,386
Dorndorf	0,397
Brunnen I	0,303
Brunnen III	0,330
Hadra	0,350
Vacha I	0,417
Vacha II	0,361

Im Rhönggebiet wurden insgesamt 15 Orte erfasst

Unteralba	0,5 mg F/l
Schleid	0,5
Kranlucken	0,5
Zella	0,3
Spahl	0,4
Oberalba	0,6
Otzbach	0,3
Motzlar	0,6
Wiesenthal	0,4
Ketten	0,6
Klings	0,3
Geismar	0,5
Gehaus	0,3
Öchsen	0,4
Empfertshausen	0,3

Aus beiden Untersuchungsgebieten wurden insgesamt 2677 Kinder untersucht. Es konnten aber nur 1896 ausgewertet werden. Weitere 781 Kinder waren in diesem Gebiet nicht dauernd ansässig. Entsprechend früheren Untersuchungen wurden die Altersgruppen von 6-9, 9-12 und 12-16 Jahren geprüft. Die vorliegenden Werte wurden an Jugendlichen von 12-16 Jahren gewonnen, damit an Gebissen, die fast ausschliesslich bleibende Zähne aufweisen. In sämtlichen Altersstufen wurden nur die bleibenden Zähne berücksichtigt. Es wurden sowohl die DMF-Flächen wie die DMF-Zähne ermittelt. Eine Zusammenstellung und zugleich ein Vergleich zwischen Werra- und Rhönggebiet ergibt, dass im Kaliegebiet mit einer höheren Kariesanfälligkeit zu rechnen ist. Auffällig ist weiterhin, dass in diesen beiden für die Stichproben ausgewählten Bezirken die Kariesanfälligkeit insgesamt bedeutend höher liegt als im Muschelkalk- und Buntsandsteingebiet in der Umgebung Jenas. Während die DMF-Flächen im Kaliegebiet bei 9,1, im Rhönggebiet bei 7,5 pro Kind liegen, sind in der gleichen Altersgruppe bei einem gleichen Fluorgehalt des Trinkwassers in den Gebieten um Jena die DMF-Flächen mit 2,4 angegeben (Tabelle 1). Die Orte Bad Salzungen, Vacha und Dorndorf stimmen in ihren Werten annähernd überein. Auch Merkers schliesst sich dem Durchschnitt an, obwohl es eine bedeutend kleinere Zahl an Untersuchten aufweist. Leimbach fügt sich nicht in das Schema ein. Auch die Zahl der DMF-Zähne ist aufschlussreich. Sie liegt sowohl für das Werragebiet wie für das Rhönggebiet in fast gleicher Höhe. Wir müssen daraus schliessen, dass die flächenhafte Ausdehnung der Karies im Werragebiet grösser ist als im Rhönggebiet.

TABELLE 1.

Werragebiet	DMF-Flächen	9,1	(n=428)
	DMF-Zähne	5,6	
Rhönggebiet	DMF-Flächen	7,5	(n=169)
	DMF-Zähne	5,3	
(Muschelkalkgebiet (Jena)	DMF-Flächen	2,4	

Verhältnis DMF-Flächen: DMF-Zähnen bei 12-16-jährigen

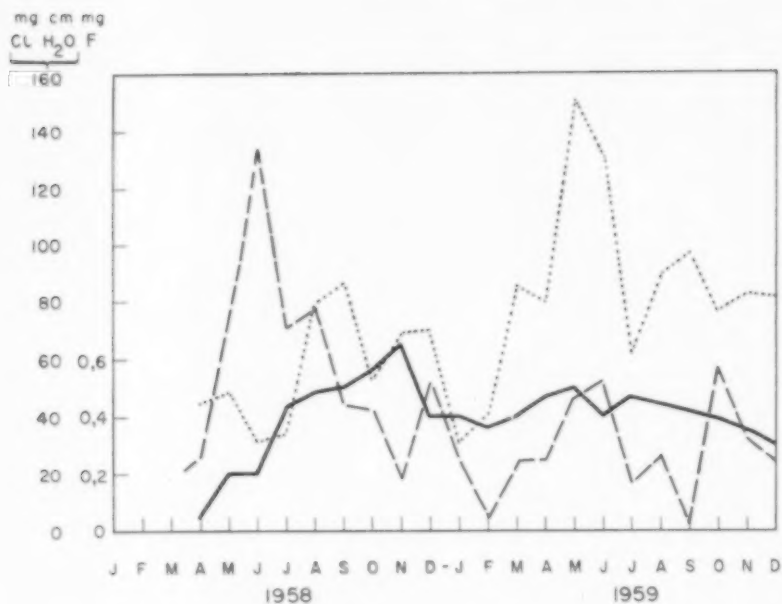


Abb. 2. Bad Salzungen. — $[F]$, - - - $[H_2O]$, $[Cl]$.

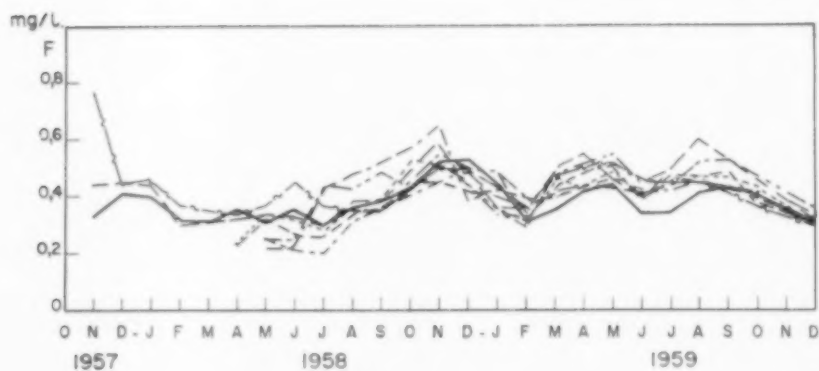


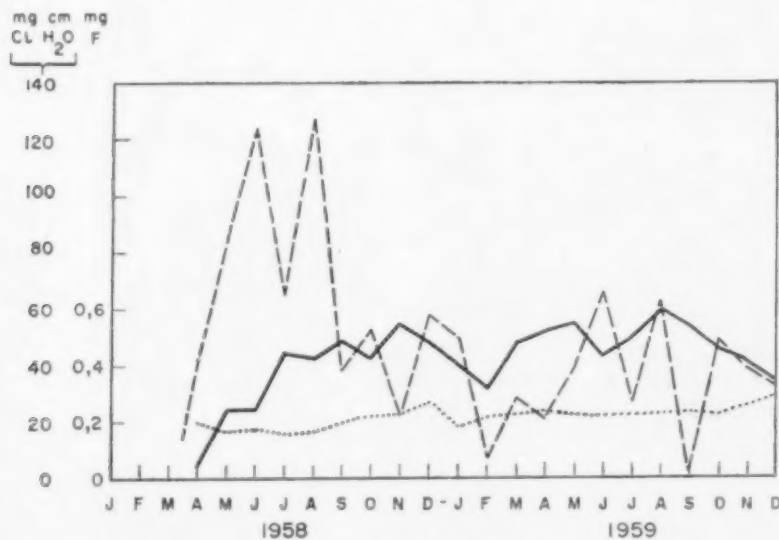
Abb. 3. Fluor-Werte.

Jenas deckt. Völlig unterschiedlich ist jedoch das Chloridaufkommen in beiden Orten. Während Vacha bei einem auffälligen Chloridgehalt eine annähernd gleichmässige Kurve zeigt, finden wir in Bad Salzungen starke Schwankungen. Diese Schwankungen sind unabhängig von den Niederschlägen. Sie hängen insgesamt mit dem Ausstoss der Endlauge und damit der Kalierzeugung überhaupt zusammen.

TABELLE 2. KARIESFREIE GEBISSE

Bad Salzungen	ansässig	zugezogen	Muschelkalkgebiet Jena
6-16-jährig	16,0% (n=350)	20,0% (n=151)	57,5% (n=878)
12-16-jährig	2,2% (n=137)	22,9% (n=70)	
Leimbach Merkers Dorndorf Vacha	5,1%	12-16-jährig	

Es macht weiterhin den Eindruck, als ob die in das Kaligebiet zugezogenen Kinder sich hinsichtlich des Kariesbefalls in einer etwas günstigeren Lage befinden als die dauernd ansässigen (Tabelle 2).

Abb. 1. Vacha. — F, --- H₂O, Cl.

Die Vergleiche wurden nicht nur bezüglich des Fluoraufkommens geführt; es wurde zugleich festgestellt, wie hoch der Gehalt an Chloriden in den betreffenden Trinkwässern ist. Die Orte Vacha und Bad Salzungen ergeben Möglichkeit, zugleich die meteorologischen Beobachtungen durchzuführen (Abb. 1 und 2). Aus den Abbildungen ist zu ersehen, dass Vacha und Bad Salzungen etwas unterschiedliche Niederschlagsmengen aufweisen. Die Fluorführung scheint jahreszeitlich etwas zu schwanken. Der Fluorgehalt des Trinkwassers ist in trockeneren Jahreszeiten offensichtlich etwas höher als in regenreichen Abschnitten, eine Beobachtung, die sich auch mit den vom Verfasser durchgeführten Messungen im Muschelkalkgebiet

Auf solche Schwankungen ist bereits bei geologischen und hydrologischen Untersuchungen hingewiesen worden. Wenn das Fluor- und Chloridaufkommen der einzelnen Brunnen graphisch dargestellt wird, so sehen wir Schwankungen in der Fluorkurve regelmässig und bei allen Brunnen annähernd gleichzeitig auftreten. (Abb. 3). Die Fluorführung selbst ist zwar unterschiedlich hoch, aber meist decken sich zu den betreffenden Zeitpunkten eine Zu- oder Abnahme des Fluorgehaltes. Ganz erhebliche Unterschiede bestehen jedoch zwischen den einzelnen Brunnen im

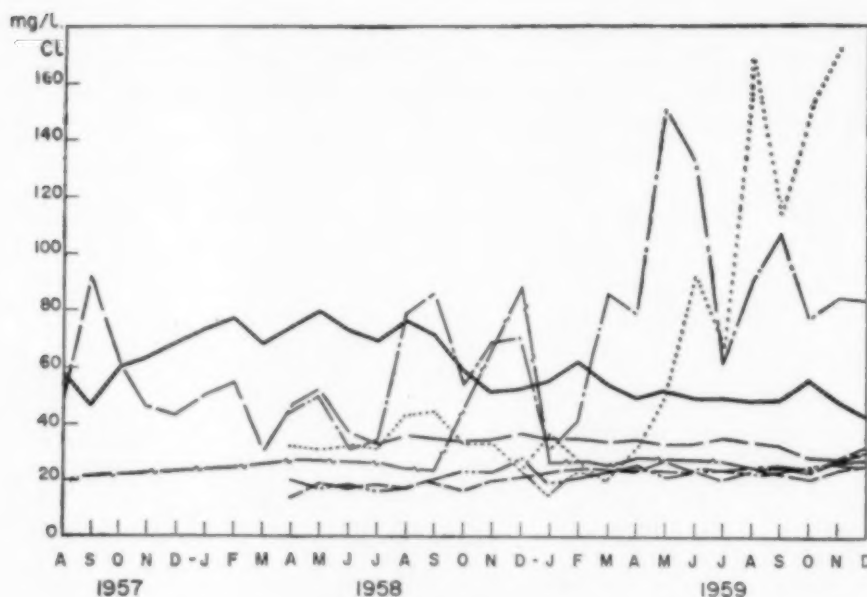


Abb. 4. Cl-Werte.

Chloridgehalt (Abb. 4). Es ist nichts Einheitliches in diesen Kurven zu finden. Diese Beobachtung stimmt mit den geologischen und orographischen Verhältnissen in dem weiter vorn beschriebenen Werrabecken überein. Einsenkungen und Auslaugungsmulden, die in der Nähe der Brunnen liegen, sammeln sich bevorzugt mit Endlagunen an und verderben in diesen Gebieten stärker als an benachbarten Orten das Trinkwasser.

Die vorstehenden Untersuchungen zeigen, dass im Werragebiet eine erheblich höhere Kariesanfälligkeit besteht als in Vergleichsgebieten Thüringens. Die älteren Jahrgänge, die jetzt erfasst wurden, entstammen einer Zeit, in der die Kalierzeugung noch nicht so hoch war wie heute. Auffallend ist der hohe Chloridgehalt einiger Brunnen und Quellen, so dass der Verdacht einer Störung des Mineralhaushaltes für das höhere Kariesaufkommen nahe liegt. Regelmässige Untersuchungen der heranwachsenden Jugend werden diese Vermutung klären.

LITERATUR

- DEUBEL, F. 1954. Zur Frage der unterirdischen Abwässerversenkung in der Kaliindustrie. *Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berl., Klasse Math.* 3.
- FISCHER, R. 1958. Med. Diss., Jena.
- HENKEL, G. 1959. Der Einfluss der Wetterverhältnisse auf die Fluorführung von Trinkwässern im Muschelkalkgebiet Jenas (Mühlthal). *Dtsch. Stomatol.* 3, 183-191.
- HOFFMAN, U. 1957. Med. Diss., Jena.
- TOMIC, D. 1960. *Gesundheitsing.* 81, 24-26.

DIE BEDEUTUNG DES KLIMATISCHEN FAKTORS IN DER KARIESÄTIOLOGIE

F. SINGER

Via Piave 2, Merano, Italien

Zusammenfassung—Um die fast ausschliessliche Einwirkung des klimatischen Faktors auf die Kariesfrequenz unter Beweis zu stellen, wurden an Südtaliern, die nach 1920 in die alpinen Regionen Norditaliens eingewandert waren und deren Ernährung dieselbe geblieben war wie an ihrem Ursprungsort, statistische Erhebungen durchgeführt, welche ergaben, dass der Kariesbefall um 12 % angestiegen war; bei den bereits im Norden geborenen Kindern sogar um 16 %.

Abstract—In order to determine the nearly exclusive influence on dental caries of the climate factor, a statistical inquiry has been made among Italians of the Southern regions, who had immigrated since 1920 into the Northern regions of Italy and whose diet had remained the same as in their native area. The result was an increase in frequency of dental caries of 12%; in children, already born in the North, even of 16%.

Résumé—Pour prouver l'influence presque exclusive du facteur climatique sur la fréquence de la carie, l'auteur a fait des recherches statistiques sur des Italiens des régions méridionales qui étaient immigrés dans les régions alpines du Nord d'Italie après 1920 et dont l'alimentation était la même que dans leur pays de naissance. La fréquence a augmenté de 12%; pour les enfants, déjà nés au Nord, même de 16%.

ALS NACH dem Ende des Ersten Weltkrieges im Jahre 1919 Südtirol von Österreich an Italien abgetreten wurde, setzte sehr bald die Einwanderung von Italienern in dieses neu erworbene Gebiet ein, u. zw. hauptsächlich aus den südlichen Provinzen wie der Campania, der Basilicata und Kalabrien, in denen wegen der Armut der Bevölkerung und des starken Geburtenüberschusses das Auswanderungskontingent seit jeher besonders hoch war.

Die klinische Beobachtung während der letzten dreissig Jahre hatte gezeigt, dass die makellosen Kauorgane der meisten eingewanderten Südtaliener nach Ablauf von vier bis fünf Jahren bereits die ersten kariösen Läsionen aufwiesen. Analoge Beobachtungen waren von Schweizer Autoren (ROOS, 1950, u.a.) bei in die Schweiz übergesiedelten italienischen Fremdarbeitern gemacht worden, ebenso von deutschen Experten (LAMMERS und HAER, 1956, u.a.) bei Georgiern und Ukrainern, bei welchen ebenso das Gebiss eine erhebliche Kariesresistenz aufweist, nicht zuletzt infolge des Konsums von Sonnenblumenöl, das besonders reich an ungesättigten Fettsäuren ist; unter diesen Südrussen wurden während des letzten Weltkrieges durch die deutsche Besatzungsmacht ganze Wehrmachtsgruppen ausgehoben und in den verschiedensten Teilen Europas eingesetzt.

Dennoch lagen bei diesen schweizerischen und deutschen Beobachtungen die Umstände wesentlich anders als im Südtirol; sowohl bei den italienischen Arbeitern

in der Schweiz als auch bei den Südrussen war nicht nur der klimatische Umweltfaktor für die erhöhte Kariesanfälligkeit ausschlaggebend, sondern vor allem die wesentlich veränderte Ernährung, ein Umstand, der bei den im Südtirol eingewanderten Italienern wegfällt—und darin liegt die eigentliche Bedeutung der vorliegenden Beobachtung—da ihre gewohnten wichtigsten Nahrungsmittel aus Mittel- und Süditalien (also aus ihrer Stammgegend) nach Südtirol importiert werden, u. zw. Spaghetti, Reis, Gemüse, Hülsenfrüchte, Obst, Käse, Wein, Öl und vor allem das für die Brotbereitung erforderliche Getreide; Milch, Butter und Eier stellen die einzigen lokalen Konsumprodukte dar. Fleischkonsum kommt aus sozialen Gründen für die breite Bevölkerungsschicht Süditaliens nur in sehr bescheidenem Ausmasse in Frage (ROCCIA, 1953; TEMPESTINI, 1957; BRIASCO, 1953; ALBANESE, 1959).



Abb. 1. Das italienische Territorium: Schwarz: Provinz Südtirol; schraffiert: die Landschaften Campania, Basilicata, Kalabrien.

Die vorliegende Arbeit hat sich daher die Aufgabe gestellt, die kariogene Wirkung des klimatischen Faktors, der in diesem Falle fast in "Reinkultur" vorliegt, statistisch zu erfassen, u. zw. nicht nur in Bezug auf die eingewanderten Süditaliener, sondern auch auf deren Kinder, welche bereits im Südtirol geboren wurden.

Die italienische Kariesstatistik ist, was die einzelnen Provinzen betrifft, durchaus nicht einheitlich; wenn die Kariesfrequenz für ganz Italien mit 92 % angegeben wird, so gibt dies nur ein summarisches Bild; die Unterschiede zwischen Nord und Süd sind ganz erhebliche: die Nordgebiete weisen den stärksten Kariesbefall auf (Ligurien 100 %, Piemont und Lombardei 94 %, die Emilia 91 %), da dort die Industriezentren

Italiens liegen und dadurch der Lebensstandard der Bevölkerung ein sehr hoher ist. Hingegen ist das Gebiss der Südtaliener kariesarm (Campania, Kalabrien, Basilicata mit 56 % Kariesbefall), ein Umstand, der auf starke Sonnenbestrahlung und vorwiegend vegetabile Frischkost zurückzuführen ist (SCHOUR und MASSLER, 1947); dazu kommt noch auf der Insel Sizilien (Kariesbefall 50 %) der durch die vulkanischen Einflüsse stark erhöhte Fluorgehalt des Trinkwassers hinzu. Die zweite grosse Mittelmeerinsel Sardinien hingegen weist eine erhöhte Kariesfrequenz (85 %) auf, allerdings bedingt durch die dort endemisch herrschende Malaria, welche die organischen Abwehrkräfte stark herabsetzt: wenn auch durch grosszügige amerikanische Hilfe die Anophelesmücke, die Überträgerin der Malaria, bis zum Jahre 1950 völlig ausgerottet wurde und daher seitdem keine frischen Malariafälle mehr zu verzeichnen sind, hat sich bis heute diese durchgreifende Sanierungsmassnahme auf das Gebiss der Bevölkerung noch nicht entscheidend auswirken können.

Die statistischen Erhebungen der ins Südtirol eingewanderten Südtaliener befassen sich mit 100 Erwachsenen (ohne Unterschied des Geschlechtes), die seit 20 bis 25 Jahren dortselbst ansässig sind, und 100 Kindern (ebenfalls ohne Unterschied des Geschlechtes, alle im Südtirol geboren) im Alter von 13 bis 16 Jahren. Die Untersuchungen wurden auf Grund des EKF-Systems durchgeführt, durch die Erfassung von je 100 Individuen sollte die statistische Ermittlung vereinfacht werden. Von Parodontose befallene Gebisse wurden in diese Statistik nicht einbezogen, um das Urteil über Kariesbefall nicht zu trüben.

Zu Vergleichszwecken sei vorausgeschickt, dass die bodenständige deutschstämmige Bevölkerung Südtirols einen fast ebenso hohen Kariesbefall (94 %) aufweist wie die Bevölkerung Österreichs; völlig kariesfreie Gebisse kommen so gut wie nicht vor.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE*

Erwachsene: Kariesbefall 68 %; 18 % wiesen ein völlig intaktes Gebiss auf;

Kinder: Kariesbefall 72 % (8 % völlig kariesfrei).

Es darf zusammenfassend festgestellt werden, dass bei den ins Südtirol aus der Campania, der Basilicata und Kalabrien eingewanderten Südtalienern sich die

TABELLE 1. ERHÖHTE KARIESANFÄLLIGKEIT BEI IN SÜDTIROL EWIGEWANDERTEN SÜDTALIENERN UNTER EINFLUSS DES KLIMAWECHSELS

Zahl der Probanden	Ursprünglicher Kariesbefall (%)	Kariesbefall nach Auswanderung (%)	Zunahme des Befalls um (%)	Kariesfreie Gebisse (%)
100 Erwachsene	56	68	12	18
100 Kinder (13-17 J.)		72	16	8

* Die angeführten Zahlen (68 % und 72 %) beziehen sich auf sämtliche untersuchten Personen im Sinne des EKF-Index; hingegen stellen die perzentuellen Angaben der kariesfreien Gebisse nur einen Teilaspekt im Rahmen dieser Untersuchung dar.

Kariesresistenz durch klimatische Faktoren vermindert hatte, u. zw. bei Erwachsenen um 12 %, bei Kindern um 16 %. Die zweite Generation der Einwanderer war also in höherem Masse kariesanfällig geworden als die Erwachsenen.

Zusätzlich zu dem klimatischen darf ein weiterer Faktor nicht ausser Acht gelassen werden: das Trinkwasser, das im Südtirol besonders arm an Mineralsalzen ist. Eine gründliche chemische Analyse des Meraner Wassers ergab folgendes Bild:

Das Wasser enthält Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium, Eisen, Aluminium, Chlor, Schwefelsäurejonen, Bikarbonat, Quarz, organische Substanzen, Kohlendioxyd, Sauerstoff, Stickstoff, Helium; es fehlen Ammoniak, Nitrite, Nitrate, Schwefelwasserstoff, Ozon, Arsen.

Die quantitative Analyse ergibt:

Jonen	Gramm pro Liter
Natrium	0,0029
Kalium	0,0005
Kalzium	0,0036
Magnesium	0,0009
Schwefelsäure	0,0040
Kohlenwasserstoffe	0,0189
Quarz	0,0167

Spurenelemente: Eisen, Aluminium, Chlor, Titanium, Strontium, Lithium.

Als Beweis für die Mineralarmut des Wassers kann auch folgender Umstand gelten: der grosse industrielle Chemie-Konzern Montecatini betätigt, in ganz Italien verstreut, eine Reihe von Fabriken; während die Wasserbehälter der Fabriken in der Toskana, in Umbrien oder Venetien im Abstand von drei bis vier Monaten von dem sich reichlich ansetzenden Kesselstein befreit werden müssen, ist diese Massnahme bei einer in der Nähe von Meran liegenden Fabrik höchstens nach Ablauf von fünf Jahren nötig. Zweifellos kommt auch dieser "Weichheit" des Wassers eine nicht zu unterschätzende Bedeutung im Rahmen der Kariesdisposition zu.

LITERATUR

- ALBANESE, P. 1959. Eziopatogenesi della carie dentaria: i fattori endogeni. *Riv. ital. Stomat.* 9, 1317-1336.
- BRIASCO, G. 1953. I danni economici della carie dentaria. *Relazione al XXVIII° Congresso Nazionale di Stomatologia*, Bari, pp. 647-669.
- LAMMERS, T. und HAER, H. 1956. *Biologie der Zahnkaries*. Huthig, Heidelberg.
- SCHOUR, J. und MASSLER, M. 1947. *J. Amer. dent. Ass.* 35, 1.
- ROCCIA, B. 1953. *Manuale di Odontologia*. Editions UTET, Turin.
- ROOS, A. 1950. Die Kriegsernährung in ihrer Bedeutung für die Entwicklung der Zahnkaries in der Schweiz. *Schweiz. Mschr. Zahnheilk.* Monographie.
- TEMPESTINI, O. 1957. La carie dentaria al lume delle nuove acquisizioni nella morfologia, biochimica e fisiologia dello smalto. *Odontes* 1, 29-48.

A NEW TECHNIQUE FOR GRINDING THIN SECTIONS OF DENTAL ENAMEL*

J. H. FREMLIN and J. MATHIESON

Birmingham University, England

Abstract—A section of tooth is first cut to a thickness of 1–1.5 mm. One face of the section is then ground flat on plate glass with Aloxite and water and polished with 6 μ diamond compound on a soft base followed by 0–0.5 μ diamond dust and water on pitch. The polished face is now stuck to a flat glass slide with Eastman Adhesive No. 910. The second face of the section is then ground down by hand with Aloxite in oil on plate glass to a thickness of about 10 μ and polished as before. Pitch softened with a few percent of turpentine, and considerable care, are needed for the final polish.

Résumé—La dent est coupée tout d'abord à une épaisseur de 1 à 1,5 mm d'épaisseur. Un des côtés de la coupe est usé à plat sur une plaque de verre avec de l'Aloxite et de l'eau, puis poli avec un composé contenant du diamant de 6 μ sur une base molle, suivi d'un polissage avec de la poussière de diamant de 0–0,5 μ et d'eau sur de la poix. La surface polie est collée ensuite sur une lame de verre plane avec de l'adhésif Eastman No 910. L'autre face de la coupe est alors usée à la main avec de l'Aloxite dans l'huile sur une plaque de verre jusqu'à une épaisseur de 10 μ et polie comme précédemment. De la poix ramollie avec un peu de térébenthine, ainsi que beaucoup de soins sont nécessaires au cours du polissage final.

Zusammenfassung—Es wird zunächst ein Zahnschliff von ca. 1–1,5 mm Dicke angefertigt. Eine Seite dieses Schnittes wird dann auf einer Glasplatte mit Aloxite und Wasser glatt geschliffen und mit einer Diamantsplitter (6 μ) enthaltenden Masse und daran anschliessend mit Wasser und Diamantstaub (0–0.5 μ) auf Pech poliert. Die polierte Seite wird nun mit Eastman Adhesive Nr. 910 auf eine glatte Glasplatte geklebt. Die andere Seite wird jetzt mit der Hand mittels Aloxite in Öl auf einer Glasplatte heruntergeschliffen bis zu einer Dicke von 10 μ . Politur wie angegeben. Für die endgültige Politur sind Pech, das mit ein wenig Terpentin erweicht wurde, und beträchtliche Sorgfalt notwendig.

* This paper is not included in the *Proceedings* because it has been submitted for publication in *Archives of Oral Biology*.

ORCA TEAM I ON CARIES STATISTICS

DIRECTIVES FOR COLLECTING AND RECORDING DATA ON DENTAL CARIES INCREMENTS BY MEANS OF SERIAL EXAMINATIONS

L. J. BAUME

Institut de Médecine Dentaire de l'Université, Genève, Suisse

I. AIMS OF DENTAL EXAMINATION

ON THE BASIS of a base-line examination, the caries experience of each individual of a chosen sample is determined. Caries experience includes the total amount of tooth substance lost owing to caries up to the time of examination; it is expressed in number and site of non-treated carious lesions, fillings and teeth missing as a result of caries. The average caries experience of the sample indicates the initial caries prevalence rate (BAUME, 1960a).

Caries increment will be determined on the basis of at least two re-examinations, each made at the end of one year. It includes the number of new discrete carious lesions (treated, filled, extracted and unattended respectively) which may have appeared since the last examination. The average score of new caries indicates the caries incidence rate of the sample.

The caries experience at the end of the study will take into account the initial prevalence rate plus the incidence rate making up the final prevalence rate of the sample.

Prevalence data are best expressed in DMF (T) or (S) scores, incidence data in terms of new discrete carious lesions and their fillings respectively (BAUME, 1958).

II. STANDARD RECORD FORM

It is recommended that a standard form be used for the recording of clinical findings with respect to each person examined. Later, the individual data can be transcribed on a perforated card for statistical evaluation.

The arrangement of a record form should conform in principle to some standards. These include:

1. The use of anatomically adequate and sufficiently large tooth diagrams (Fig. 1).
 - (a) Each tooth (anterior as well as posterior) should be allotted five surfaces.
 - (b) Primary teeth and permanent teeth are separately represented.
 - (c) Wisdom teeth may be omitted from charts for statistical purposes.
2. Each form should include at least three sets of anatomical diagram systems of both dentitions. In each set, space is provided for the actual dental formula.

- (a) Blind recording is necessary for at least the last examination in order to establish a statistically valid, final prevalence rate.
- (b) Increments in terms of new cavities may be ascertained at the time of re-examination by using the records of the previous examination; in this case only the actual changes (caries increments) are recorded.
- (c) The alternative recommended by statisticians consists in blind recording the actual caries experience each time the dentition is re-examined. The increments then are extrapolated by statistical processing and not by immediate observation. This increases the danger of reversals, that is the tabulation of a lesion at the first examination and its absence at the succeeding examinations.

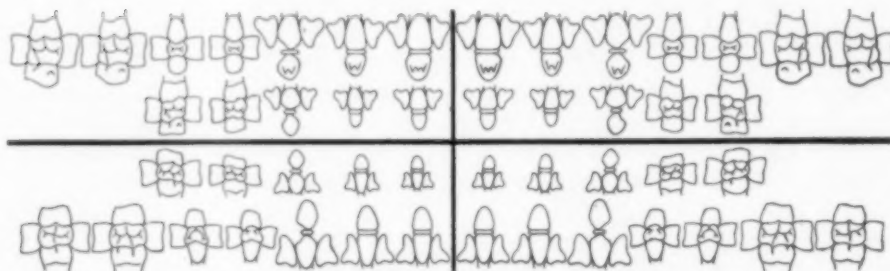


FIG. 1. Example of tooth diagram. (Reduced to three-fifths actual size).

3. On a central part of the form, personal details should be given such as: full name, address, school, date and place of birth, occupation of father and previous addresses, where necessary. (In order to save time, the parents of children to be examined should give these particulars before the examination, on a special form provided for the purpose. It has been noted that as a rule children are unable to give accurate answer to the questions on the standard examination form.)
4. At each of the three examinations, supplementary information should be obtained with regard to oral hygiene, dietary habits, etc.—items referred to under Section IV.

III. RECORDING OF THE BASE-LINE CARIES EXPERIENCE (PREVALENCE)

The examination should be as accurate and objective as possible, and for this reason it is essential that it be performed in a well-equipped dental consulting room and always by the same dental practitioner. At least 25 min should be devoted to the examination of each subject.

Two bite-wing radiographs taken orthogonally and under standard conditions should be made for each patient. The "long-cone" tube (20 cm) is best suited for this examination. The developing should also be done under standard conditions. It is preferable to have the radiographs at hand during the examination so that others can be taken in case of uncertainty. If, for financial reasons, it is not possible to

take bite-wings of each patient, at least a sufficient number of subjects should be examined in this way to determine the amount of error without X-ray. In the 5-12 years age-group, the error is only slight with respect to the permanent teeth. (For standard X-ray technique see BACKER-DIRKS, 1951).

After standard evaluation of oral hygiene and of mucilaginous plaque (see point IV), the crown of each tooth should be mechanically cleaned up to the neck (with rubber cup and pumice) and dried separately (air syringe, saliva pump). When dry, each tooth should be examined in direct and in reflected light with the aid of a mirror and probe.

Great care should be exercised in the choice of probes. All probes used should be of the same trademark and of standard dimensions. The number of examinations per probe should be limited.

A systematic method of examination is also recommended; for example, commencing at the lower right and proceeding along the lower teeth and then passing to the upper teeth on the left.

The findings should be recorded by the examiner himself, as in every case the site and extent of the dental lesion or of the filling must be recorded exactly on the dental chart.

The following details should be recorded:

1. *Dental formula*

This is inserted into the pertinent field; it comprises the existing primary teeth (in Roman numbers) and permanent teeth completely erupted (in Arabic figures). Teeth which are about to erupt should be indicated in brackets, and no mention should be made of missing teeth in the formula.

On the diagrams, on the other hand, the missing teeth should be indicated by drawing a box around the tooth in question and classifying it as follows:

X = tooth missing as a result of caries (extracted or indicated for extraction);

O = tooth missing for other reasons (orthodontic treatment, accident, etc.);

? = teeth missing for unknown reasons;

Y = deciduous tooth shed, permanent successor not yet erupted.

X-ray examination will make it possible to indicate:

A = tooth missing due to agenesis;

B = tooth missing due to impaction.

2. *Primary caries*

Positively diagnosed carious lesions. Any positively diagnosed carious lesion (cavity) discernible by physical or/and radiological examination should be recorded on the diagram very accurately with a sharp pencil. Indications should include: site, size, extent. The extent of the carious surface should be outlined and not be filled in.

Interproximal caries. Interproximal caries which have been diagnosed with certainty by X-ray as reaching the dentine is recorded as primary caries.

Incipient and arrested caries. A chalky patch with roughened surface, a fissure in which the probe can "stick", with chalky edges, may be true caries. However, it may be arrested and on smooth surfaces even may disappear through recalcification.

- (a) Blind recording is necessary for at least the last examination in order to establish a statistically valid, final prevalence rate.
- (b) Increments in terms of new cavities may be ascertained at the time of re-examination by using the records of the previous examination; in this case only the actual changes (caries increments) are recorded.
- (c) The alternative recommended by statisticians consists in blind recording the actual caries experience each time the dentition is re-examined. The increments then are extrapolated by statistical processing and not by immediate observation. This increases the danger of reversals, that is the tabulation of a lesion at the first examination and its absence at the succeeding examinations.

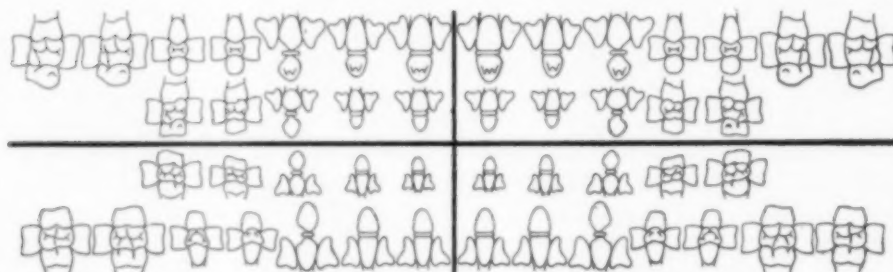


FIG. 1. Example of tooth diagram. (Reduced to three-fifths actual size).

3. On a central part of the form, personal details should be given such as: full name, address, school, date and place of birth, occupation of father and previous addresses, where necessary. (In order to save time, the parents of children to be examined should give these particulars before the examination, on a special form provided for the purpose. It has been noted that as a rule children are unable to give accurate answer to the questions on the standard examination form.)
4. At each of the three examinations, supplementary information should be obtained with regard to oral hygiene, dietary habits, etc.—items referred to under Section IV.

III. RECORDING OF THE BASE-LINE CARIES EXPERIENCE (PREVALENCE)

The examination should be as accurate and objective as possible, and for this reason it is essential that it be performed in a well-equipped dental consulting room and always by the same dental practitioner. At least 25 min should be devoted to the examination of each subject.

Two bite-wing radiographs taken orthogonally and under standard conditions should be made for each patient. The "long-cone" tube (20 cm) is best suited for this examination. The developing should also be done under standard conditions. It is preferable to have the radiographs at hand during the examination so that others can be taken in case of uncertainty. If, for financial reasons, it is not possible to

take bite-wings of each patient, at least a sufficient number of subjects should be examined in this way to determine the amount of error without X-ray. In the 5-12 years age-group, the error is only slight with respect to the permanent teeth. (For standard X-ray technique see BACKER-DIRKS, 1951).

After standard evaluation of oral hygiene and of mucilaginous plaque (see point IV), the crown of each tooth should be mechanically cleaned up to the neck (with rubber cup and pumice) and dried separately (air syringe, saliva pump). When dry, each tooth should be examined in direct and in reflected light with the aid of a mirror and probe.

Great care should be exercised in the choice of probes. All probes used should be of the same trademark and of standard dimensions. The number of examinations per probe should be limited.

A systematic method of examination is also recommended; for example, commencing at the lower right and proceeding along the lower teeth and then passing to the upper teeth on the left.

The findings should be recorded by the examiner himself, as in every case the site and extent of the dental lesion or of the filling must be recorded exactly on the dental chart.

The following details should be recorded:

1. *Dental formula*

This is inserted into the pertinent field; it comprises the existing primary teeth (in Roman numbers) and permanent teeth completely erupted (in Arabic figures). Teeth which are about to erupt should be indicated in brackets, and no mention should be made of missing teeth in the formula.

On the diagrams, on the other hand, the missing teeth should be indicated by drawing a box around the tooth in question and classifying it as follows:

X = tooth missing as a result of caries (extracted or indicated for extraction);

O = tooth missing for other reasons (orthodontic treatment, accident, etc.);

? = teeth missing for unknown reasons;

Y = deciduous tooth shed, permanent successor not yet erupted.

X-ray examination will make it possible to indicate:

A = tooth missing due to agenesis;

B = tooth missing due to impaction.

2. *Primary caries*

Positively diagnosed carious lesions. Any positively diagnosed carious lesion (cavity) discernible by physical or/and radiological examination should be recorded on the diagram very accurately with a sharp pencil. Indications should include: site, size, extent. The extent of the carious surface should be outlined and not be filled in.

Interproximal caries. Interproximal caries which have been diagnosed with certainty by X-ray as reaching the dentine is recorded as primary caries.

Incipient and arrested caries. A chalky patch with roughened surface, a fissure in which the probe can "stick", with chalky edges, may be true caries. However, it may be arrested and on smooth surfaces even may disappear through recalcification.

Incipient and arrested caries that has not reached the stage of cavitation should be outlined on the diagram indicated by the Arabic number 1 as so-called "questionable caries". Incipient proximal caries only diagnosed by X-ray and not affecting the dentine should be indicated by the sign: <)

Secondary caries on the margin of fillings, etc. These should be shown on the diagram by the letter "S" with indication of their size.

3. Primary filling

The extent of the filling present at the base-line examination should be outlined accurately on the diagram and filled in with coloured pencil.

4. Crowns and bridges

These should be indicated in some special way (for example, with coloured lines); the history for their insertion should be established (caries, accident, agenesis, hypoplasia, etc.) and recorded.

IV. SUPPLEMENTARY DATA

The connotation of any observations makes only sense if the criteria are well defined, and recorded in a systematic and reproducible manner.

(a) *Pulp treatments.* These can only be diagnosed with the aid of radiography. The recording of these is of interest but optional.

□ = pulp capping, pulpotomy, this should be marked within the pertinent tooth diagram with a small square;

M = mummification;

W = radicular filling.

(b) *Attrition (abrasion) or erosion exposing the dentine.* The extent of these conditions should be indicated by dots on the chart, accompanied by the letter K.

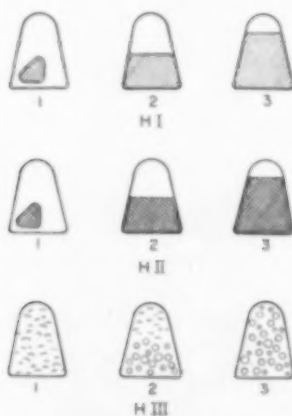


FIG. 2

(c) *Enamel defects: hypoplasia of first, second or third degree.* Enamel defects should be graded according to the following criteria:

H I: Opaque patches on the enamel, without roughness, classified according to size.

1. In one-third only of the incisive surfaces;
2. In two-thirds of the incisive surface;
3. In more than two-thirds of the incisive surface.

H II: Patches of yellowish-brown pigmentation on the enamel, without roughness, classified according to extent as for H I.

1. In one-third only on incisive surface;
2. In two-thirds of incisive surface;
3. In more than two-thirds of incisive surface.

H III: Hypoplasia of the enamel, defects in surface, classified according to nature and distribution.

1. Part or all of the surface covered with dents but not pits;
2. Surface with or without dents but with 50 per cent pits;
3. More than 50 per cent of surface covered with more or less deep pits.

Dean classification

- H I 1-2 = very mild
H I 3 = mild
H II 1-3 = medium
H III 1-3 = serious

(d) *Oral hygiene.* When it is desired to make a thorough and standard evaluation of dental hygiene, a distinction must be made between soft mucilaginous plaques attached to the surface of the teeth before cleaning, coloured or hard plaques which persist after cleaning of the surface and, finally, the various types of calculus.

For evaluation of hygiene, only the mucilaginous plaques are taken into account; the calculus serves as an indicator for the periodontal indices according to RUSSELL (1956) or RAMFJORD (1957).

The presence of soft mucilaginous plaque is ascertained by means of a 2% aqueous solution of mercurochrome which is applied to the whole surface of all teeth which have completely erupted; this is followed by thorough rinsing with water. Each tooth must be examined with the aid of a mirror to determine the quantity of soft plaque and marks 0-3 should be given as follows:

- 0 = no staining (with mercurochrome); no plaque;
1 = staining confined to certain tooth surfaces;
2 = regular staining of all necks and interproximal surfaces but confined to one-third of the crown from the gingival end;
3 = staining over half of the crown from the gingival margin.

The degree of individual hygiene is established by relating the number of marks given to each tooth to the number of teeth examined.

After examination of these soft plaques, the teeth should be cleaned with pumice and a rubber cup so that any hard or coloured plaque (excluding tartar) may be detected. Indication of findings should be as follows:

Colour: black, light or dark brown, light or dark green, yellow, orange.

Localization and distribution: anterior, posterior teeth (one third, two thirds, all, etc.).

(e) *Conditions of gingiva.* PMA index grading after Mühlemann.

(f) *Tooth brushing habits.* Individual tooth brushing habits may be evaluated by the following criteria:

Quantitative: several times per day; once regularly; occasionally.

Qualitative: excellent ; good ; inadequate.

The aim of an incidence study may necessitate further information regarding food habits, ingestion and topical use of fluorides, etc.

V. RE-EXAMINATIONS

The second examination should be carried out, after an interval of exactly one year, and by the same examiner so as to eliminate any possibility of subjective error. (The alternative conditions regarding blind recording are indicated in Section II).

(a) The prevalence type of study should be made exactly under the same conditions as the first. Blind recording is a prerequisite. At least two new bite-wings are taken; the caries experience of the entire dentition is established without consulting the previous records.

(b) Data for the incidence type of study on the basis of new caries may be collected differently. Only the changes that have taken place since the previous examination are recorded. For this purpose, the examiner must have before him the previous form and bite-wing radiographs. The following changes must be carefully recorded on a second diagram:

1. New, positively diagnosed, untreated caries;
2. New incipient (questionable) caries;
3. New, untreated secondary caries;
4. Spread of an old, untreated primary or secondary caries;
5. New filling (previous primary caries filled);
6. Immediate filling (new caries filled immediately);
7. Loss of a tooth (reason).

The supplementary data will be ascertained as for the first, basic examination.

A third, and possibly a fourth examination after 2 and 3 years respectively will make the data more informative. The difficulty of diagnosing new caries with certainty after 1 year is greater than is generally supposed (BAUME, 1960b).

At the final re-examination blind recording of actual caries experience is recommended for any type of study. This can be complemented by a succeeding direct check on the caries increment that has taken place since the previous re-examination. For this purpose the records are of the final caries experience and the last year caries increments are recorded on separate diagrams.

KEY TO SIGNS USED

- X = tooth missing due to caries (extracted, or completely decayed crown).
O = tooth extracted for other reasons (orthodontic treatment, accident, etc.).
? = tooth missing for unknown reasons.
Y = exfoliated deciduous tooth where the permanent tooth has not yet erupted.
A = tooth missing due to agenesis.
R = tooth missing due to inclusion.
< > = interproximal caries which can only be diagnosed by X-ray.
I = potential initial caries.
S = secondary caries.
□ = pulpotomy diagnosed by X-ray.
M = mummification diagnosed by X-ray.
W = radicular filling diagnosed by X-ray.
K = abrasion, erosion.

H I-III = different types of hypoplasia classified 1-3 according to surface covered.

REFERENCES

- BACKER-DIRKS, O. 1951. A reproducible method of caries evaluation. *J. dent. Res.* **30**, 346.
BAUME, L. J. 1958. Evaluation of caries preventive procedures. *Proceedings of the 5th Congress ORCA*.
BAUME, L. J. 1960a. General principles concerning the international standardisation of dental caries statistics. A, Classification. B, Terminology. C, Description of study. *Joint Subcommittee of the FDI on Standardisation of Caries Recording Methods*, Geneva.
BAUME, L. J. 1960b. Standardisation internationale des statistiques sur la carie dentaire. *Z. Präventivmed.* **5**, 153-160.
RAMFJORD, S. P. 1957. *Report on Periodontal Disease in India*. Seminar and Survey World Health Organization—Regional Office for South East Asia.
RUSSELL, A. L. 1956. A system of classification and scoring for prevalence survey of periodontal disease. *J. dent. Res.* **35**, 350.

ARBEITSBERICHT ORCA-TEAM III*

K.-E. QUENTIN

TEAM III "Fluorbestimmung in Wässern" wurde von der ORCA im Jahre 1956 gegründet und hat in vierjähriger Tätigkeit die ihm gestellten Aufgaben erfüllt. Vorstand und Mitgliederversammlung der ORCA beschlossen daher 1960 auf dem Kongress in Hamburg, diese Team-Arbeit mit der bisherigen Zielsetzung als beendet anzusehen. Nachfolgend wird als Extrakt der verschiedenen Team-Beratungen und der Team-Rundschreiben 1-14 ein kurzer Abschlussbericht gegeben.

Die eingehende Beschäftigung mit der Fluorbestimmung in Wässern führte zunächst zu dem Beschluss, jeglichen Zusatz von Fluor zum Wasser, zu Lebensmitteln etc. als "Fluoridierung", nicht aber als Fluorierung zu bezeichnen. In chemischer Hinsicht ist das Fluorid-Ion F^- die massgebende Komponente. Diese Bezeichnung entspricht auch den Normen der "International Union of Pure and Applied Chemistry" (I.U.P.A.C.).—Für die Überwachung des Fluorgehaltes in Trinkwasser-Fluoridierungsanlagen wurde ein einfaches Farbvergleichsverfahren in Nessler-Zylindern ausgearbeitet, mit dem unter Benutzung der Ausbleichung des Zirkon-Alizarin-Farblackes der Fluorgehalt im Wasserwerk laufend colorimetrisch überprüft werden kann (QUENTIN, 1957). Zu dieser Überwachung fasste Team III in Brüssel 1958 noch folgende Resolution: "Die grosse Verantwortung der Behörden gegenüber der Bevölkerung hinsichtlich einer exakten Dosierung des Fluors in Wasseranlagen mit fluoridiertem Trinkwasser erfordert eine ständige Kontrolle des Fluorgehaltes im Wasser. Es wird daher empfohlen, täglich den Fluorgehalt mittels der von der ORCA vorgeschlagenen einfachen Farbvergleichsmethode zu prüfen und darüber hinaus wöchentlich einmal eine grundlegende Fluorbestimmung (Destillation und spektralphotometrische Ermittlung) vorzunehmen. Für eine ausreichende Kontrolle der Fluorwerte im Verteilernetz und an den Endsträngen ist ebenfalls Sorge zu tragen".

Als weitere Aufgabe war vom Team die quantitative Bestimmung kleiner Fluormengen bis zu ca. 60 Mikrogramm (μg) bzw. Gamma (γ) entsprechend 0,06 Milligramm pro Liter Wasser zu bearbeiten. Über das erprobte und beschlossene Verfahren wurde 1958 auf dem Kongress in Brüssel berichtet (QUENTIN und INDINGER, 1959). In der Folgezeit befasste sich das Team mit der weiteren Verbesserung der Methodik, insbesondere mit der Einführung einer automatisch gesteuerten Destillationsapparatur, der Stabilität der Farbreagenzien, den Blindwerten u.dgl. In diesem Zusammenhang

* Team-Mitglieder: Dr. BACKER-DIRKS/Utrecht; Dr. BUYDENS/Brüssel; Dr. DUSTIN/Brüssel; Prof. EICHLER/Heidelberg; Dr. HARDWICK/Birmingham; Prof. KNAPPWOST/Tübingen; Ing. LINGELBACH/Karl-Marx-Stadt; Dr. NOMMIK/Uppsala; Dr. TOMIC/Zagreb; Dr. WINIKER/Berlin-Ost.

war es auch notwendig, die chemisch-analytische Fachliteratur zu sammeln, um innerhalb der ORCA mit der neuesten Entwicklung der Fluor-Analytik ständig vertraut zu sein. Nach der Ausarbeitung von Verfahren zur Fluorbestimmung in Wässern (anorganisches Material) wurde damit begonnen, die Fluorbestimmung in fluoridierten Speisesalzen und die Ermittlung des Fluors in Lebensmitteln sowie biologischen Flüssigkeiten (organisches Material) zu untersuchen. Gleichzeitig wurden auch die ersten Listen über den Fluorgehalt der Lebensmittel anhand der Literatur zusammengestellt. Eine weitere Arbeit des letzten Jahres war die Ausarbeitung von Erhebungsbogen in deutsch, englisch und französisch. Sie ging von dem Gedanken aus, dass die ORCA über die Wasserfluoridierungsanlagen in Europa, aber auch in anderen Erdteilen informiert sein sollte. Dies gilt für die Art der Fluoridierung, für die Art des Wassers, die technischen Anlagen, die Wasserversorgung und den Wasserverbrauch, die zahnärztlichen Erhebungen u.dgl. So wurde ein Erhebungsbogen mit 36 Fragen entwickelt, der nunmehr von der ORCA verschickt wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Team III hat in den 4 Jahren seines Bestehens die Bearbeitung folgender Themen eingeleitet oder zu einem gewissen Abschluss gebracht:

- (1) Ausarbeitung eines einfachen Überwachungsverfahrens der Trinkwasserfluoridierung im Wasserwerk durch Fluorbestimmung mittels Farbvergleich;
- (2) Aufstellung von Grundsätzen der Überwachung von Trinkwasserfluoridierungsanlagen;
- (3) Ausarbeitung einer quantitativen Bestimmungsmethode für kleine Fluormengen mittels elektrocoulometrischer Farbmessung nach Abtrennung des Fluorids durch Säuredestillation; Prüfung des Verfahrens innerhalb des Teams durch Fluoranalysen an Hand gegenseitig zugesandter Fluor-Testlösungen;
- (4) Bearbeitung der Methodik zur Fluorbestimmung in fluoridierten Speisesalzen, in Lebensmitteln und biologischen Flüssigkeiten;
- (5) Zusammenstellung der chemisch-analytischen Fachliteratur ab 1956;
- (6) Ausarbeitung eines dreisprachigen Erhebungsbogens, der allgemeine, technische, chemische und ärztliche Gesichtspunkte der Wasserfluoridierungsanlagen enthält.

LITERATUR

- QUENTIN, K.-E. 1957. Quantitative Fluoridbestimmung und Überwachung der Trinkwasserfluoridierung. *Odont. Revy* 8, 6-18.
- QUENTIN, K.-E. und INDINGER, J. 1959. Die quantitative Fluoridbestimmung. *Z. Lebensmittelforsch.* 110, 249-260.

**END OF
VOL.**

Vol.
4
1961

ol.
4
961